

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie Civil, Electrochimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Bertrand REUILLARD**

Thèse dirigée par **Serge COSNIER** et  
codirigée par **Alan LE GOFF**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**  
(**Equipe Biosystèmes électrochimiques et analytiques**)  
dans l'**École Doctorale I-MEP 2**

## Elaboration de bioélectrodes à base de nanotubes de carbone pour la réalisation de biopiles enzymatiques Glucose/O<sub>2</sub>

Thèse soutenue publiquement le **3 décembre 2014**,  
devant le jury composé de :

**Monsieur, Donal, LEECH**

Professeur à l'Université de Galway (Irlande), Rapporteur

**Monsieur, Nicolas, MANO**

Chargé de recherche CNRS, Bordeaux, Rapporteur

**Monsieur, Fabrice, THOMAS**

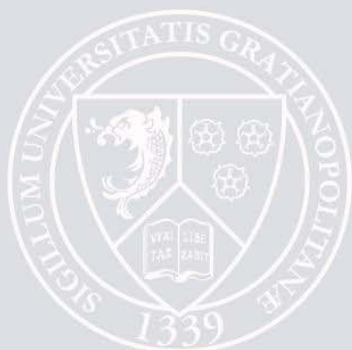
Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble, Président

**Monsieur, Alan, LE GOFF**

Chargé de recherche CNRS, Grenoble, Examinateur

**Monsieur, Serge, COSNIER**

Directeur de recherche CNRS, Grenoble, Invité





## **Remerciements :**

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Département de Chimie Moléculaire (DCM) de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG). Je remercie le Docteur Serge Cosnier, directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli et permis de travailler dans d'excellentes conditions pendant ces trois années.

Je remercie vivement le Professeur Donal Leech, professeur à l'Université de Galway, et le Docteur Nicolas Mano, chargé de recherche CNRS au Centre de Recherche Paul Pascal de Bordeaux d'avoir accepté d'examiner et de juger ce manuscrit en tant que rapporteurs.

Je tiens à remercier également le Professeur Fabrice Thomas, professeur à l'Université de Grenoble, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et de juger mes travaux.

Je souhaite leur faire part de toute ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont témoigné à ce travail de thèse, pour l'expertise qu'ils ont apportée et pour leurs appréciations.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à mes deux directeurs de thèse, le Docteur Alan Le Goff et le Docteur Serge Cosnier, qui m'ont encadré et qui ont dirigé mes travaux pendant ces trois années au sein de l'équipe Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques (BEA) du DCM. Je les remercie de leur présence attentive et de l'aide apportée durant toute cette période. En particulier, merci à Alan, qui m'a accordé sa confiance, au départ, pour mener ces travaux, alors que d'autres portes s'étaient fermées. Il m'a offert la chance de travailler sur ce projet ambitieux et je le remercie de tout le savoir, de toute la passion qu'il a su me transmettre. Je n'oublierai jamais les divagations scientifiques, ou autres (... !), que nous avons pu partager au quotidien.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement le Docteur Chantal Gondran pour le temps qu'elle a passé à me transmettre une partie de son immense savoir en électrochimie, mais également à corriger ma thèse: si ce manuscrit a su plaire au jury, c'est aussi grâce à toi, Chantal. Merci pour ta pédagogie, ta bonne humeur et ton soutien durant ces trois ans.

Je souhaite également remercier les Docteurs Aurélie Bouchet-Spinelli et Liliane Guérente, qui m'ont encadré au cours de mon « enfance scientifique » (en M2) et m'ont donné le goût de la recherche, tout en m'épaulant dans les moments difficiles qui ont précédé mon engagement au DCM.

Pendant les trois années écoulées, j'ai eu l'occasion de travailler avec de nombreuses personnes au sein de l'équipe BEA et d'autres équipes du DCM. Merci à tous ceux qui m'ont aidé dans mes travaux, directement ou indirectement. Je remercie Jérôme Blu, qui a passé du temps sur des synthèses longues, et diversement passionnantes ! Merci aussi à Damien Jouvenot, pour ses précieux conseils en synthèse organo-métallique, et au service de caractérisation RMN et spectrométrie de masse, pour les excellentes conditions de travail. Je tiens également à citer les différentes collaborations dans lesquelles nous avons été engagés: à Dublin, avec le Professeur Duesberg (grâce à Michael Holzinger), et à Rennes, avec le Docteur Frédéric Barrière (les bactéries sont-elles l'avenir des biopiles ??!).

Mes remerciements vont aussi à tous les membres de l'équipe BEA: cela a été un immense honneur de travailler avec vous, dans des conditions idéales et dans une ambiance très conviviale. Par ordre chronologique, je remercie les Docteurs Kamal Elouarzaki et Charles Agnès, qui m'ont pris sous leur aile dès mon arrivée au laboratoire. Je leur dois beaucoup quant à mon assimilation rapide des « bases » de l'électrochimie (je pense que l'on se souviendra toujours du temps des « pastilles »). A Kamal, avec qui j'ai partagé un bureau pendant plus de trois ans, dans les bons comme dans les mauvais moments, je souhaite bon courage et plein succès pour la suite, notamment à Singapour !

Plus récemment, Noémie et Fatima sont arrivées au laboratoire pour leur thèse et je suis heureux de les avoir rencontrées: merci à vous deux, avec qui j'ai passé de formidables années, au laboratoire et à l'extérieur (n'est-ce pas ?!!). J'espère que nous ne nous perdrons pas de vue. Que la force soit avec vous (mais je n'ai aucun doute à ce sujet)! Merci aussi à Fabien: c'est un peu grâce à toi que j'ai commencé ici, si je me souviens bien. Cela a été un plaisir de te rencontrer, et de passer du temps avec toi au labo (et en dehors).

Je remercie également les autres membres de l'équipe BEA. Les permanents : Arielle, Karine et Michael, sans qui l'équipe ne tournerait pas aussi bien ! Merci à vous pour votre aide et vos conseils pendant ces trois ans. Merci aussi aux non permanents : Solène (l'avenir te sourit !), Caroline (c'est bien parti !), Quentin, Maryam, Rhaouda (bon courage pour la suite !). Imen, Lumi, Saro, Deonildo, je vous souhaite toute la réussite que vous méritez.

Merci aux autres personnes du bâtiment Nanobio (au 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup>) : Hugues, Drhuv, Marie, Carlo et Adrien (« les choses se passent à fond »). Merci de m'avoir laissé utiliser votre UPMS ! Un immense merci aussi à mon ami Baptiste, inutile de préciser pourquoi ! On se revoit Outre-Manche ! Je saisis aussi cet instant pour remercier tous les copains, clermontois ou grenoblois, pour leur accompagnement, de près ou de loin, pendant toutes ces années.

Enfin, je souhaite remercier toute ma famille, et en particulier ma femme, Nikita, et mes parents. Leur solide soutien m'est précieux et je leur dois beaucoup. C'est là l'occasion de le leur dire du fond du cœur.



# Sommaire

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>I. Etude bibliographique</b>	<b>7</b>
<b>I.1 Les biopiles enzymatiques</b>	<b>9</b>
I.1.1 Contexte général	9
I.1.2 Les biopiles à combustible	9
I.1.2.1 Principe d'une pile à combustible	9
I.1.2.2 Les biopiles à combustible	11
I.1.3 Les biopiles glucose-O <sub>2</sub>	17
I.1.3.1 Principe et applications	17
I.1.3.2 Les systèmes enzymatiques pour biopiles glucose-O <sub>2</sub>	19
<b>I.2 Immobilisation et connexion enzymatique sur électrode</b>	<b>24</b>
I.2.1 Généralités	24
I.2.2 Méthodes d'immobilisation de biomolécules	25
I.2.2.1 Principe	25
I.2.2.2 Adsorption	26
I.2.2.3 Réticulation	26
I.2.2.4 L'encapsulation	27
I.2.2.5 Assemblages supramoléculaires	28
I.2.2.6 Immobilisation par formation d'un lien covalent	29
I.2.3 Transfert électronique protéine-électrode	31
I.2.3.1 Transfert électronique direct/indirect	31
I.2.3.2 DET et MET à la biocathode pour la réduction de O <sub>2</sub>	33
I.2.3.3 DET et MET à la bioanode pour l'oxydation du glucose	37
<b>I.3 Intégration des nanotubes de carbone dans les biopiles glucose-O<sub>2</sub></b>	<b>41</b>
I.3.1 Structures, propriétés et utilisations des nanotubes de carbone	41

I.3.1.1 Structures et propriétés	41
I.3.1.2 Les nanotubes de carbone comme matériau d'électrode	44
I.3.1.3 Modifications et fonctionnalisation des CNTs	45
I.3.2 Les CNTs pour l'immobilisation et la connexion d'enzymes rédox dans les biopiles glucose-O <sub>2</sub> pour l'implantable	50
I.3.2.1 Electrodes à base de CNTs pour la connexion enzymatique	50
I.3.2.2 Biopiles glucose-O <sub>2</sub> à base de CNTs	52
<b>I.4 Implantations des biopiles glucose-O<sub>2</sub></b>	<b>55</b>

## **II. Macroélectrodes nanostructurées de CNTs : conception de nouvelles bioélectrodes pour les biopiles glucose-O<sub>2</sub> implantables**

<b>II.1 Introduction</b>	<b>73</b>
<b>II.2 Bioanode nanostructurée à base de GOx par transfert électronique indirect</b>	<b>76</b>
II.2.1 Incorporation d'un médiateur rédox « insoluble » : 1,4-Naphtoquinone	76
II.2.2 Etudes de différentes membranes pour l'optimisation de la diffusion au sein de la matrice 3D	79
II.2.3 Effet de la quantité de NQ sur la catalyse	83
II.2.4 Autres médiateurs de types « quinone »	86
<b>II.3 Cathodes 3D à bases d'enzymes à cuivre</b>	<b>91</b>
II.3.1 Réduction de O <sub>2</sub> par les MCOs	91
II.3.2 Cathode MWCNTs/Laccase en transfert direct	93
II.3.3 Cathode MWCNTs/Tyrosinase en transfert direct	94
<b>II.4 Biopiles GOx-NQ / Lac ; GOx-NQ/PPO</b>	<b>98</b>
II.4.1 Performances des biopiles GOx-NQ/Laccase et GOx-NQ/PPO	99
II.4.2 Stabilité en fonctionnement et stockage de la biopile GOx-NQ/Lac	101
II.4.3 Alimentation d'une DEL avec une biopile GOx-NQ/Lac	105
<b>II.5 Conclusions</b>	<b>106</b>

### **III. Fonctionnalisation de CNTs avec des catalyseurs moléculaires d'oxydation de NADH pour la connexion d'enzymes NAD<sup>+</sup> dépendantes**

**111**

#### **III.1 Introduction**

**113**

III.1.1 Les déshydrogénases NAD<sup>+</sup>-dépendantes

113

III.1.2 Régénération du cofacteur NAD<sup>+</sup>

115

III.1.3 Immobilisation du catalyseur d'oxydation de NADH

118

#### **III.2 Elaboration d'une bioanode à base de Glucose déshydrogénase : approche par capture de l'enzyme dans un composite CNTs/métallopolymère**

**119**

III.2.1 Principe et caractérisation du monomère et du polymère

119

III.2.2 Oxydation électrocatalytique de NADH sur les électrodes de GC et MWCNTs fonctionnalisées par poly-[RuII(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]

123

III.2.3 Propriétés d'encapsulation du métallopolymère

128

III.2.4 Bioanode MWCNTs/ poly-[RuII(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]-GDH

130

#### **III.3 Elaboration d'une bioanode à base de Glucose déshydrogénase : approche supramoléculaire**

**133**

III.3.1 Caractérisation du complexe RuQ-pyrène

133

III.3.2 Immobilisation sur MWCNTs et catalyse de NADH

134

III.3.3 Elaboration de la bioanode MWCNT/RuQ-pyrène/GDH

137

III.3.4 Comparaison des approches supramoléculaire et polymérique

141

III.3.5 Conception d'un biopile glucose-O<sub>2</sub> par combinaison de l'anode MWCNTs/RuQ-Pyrène-GDH avec une cathode de Bilirubin Oxidase

145

#### **III.4 Conclusion du chapitre 3**

**147**

### **IV. Cathode bi-enzymatique pour la réduction de O<sub>2</sub>**

**153**

#### **IV.1 Réduction électrocatalytique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : une alternative au MCOs**

**154**

IV.1.1 Principe

155

IV.1.2 Réduction enzymatique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les peroxydases

156

IV.1.3 Alternative aux cathodes à base de MCOs	159
<b>IV.2 Modification supramoléculaire des CNTs pour l'immobilisation et la connexion de HRP</b>	<b>161</b>
<b>IV.3 Cathode bi-enzymatique GOx-HRP</b>	<b>169</b>
<b>IV.4 Application de la biocathode GOx-HRP à une biopile glucose-O<sub>2</sub></b>	<b>172</b>
<b>IV.5 Conclusions</b>	<b>175</b>
 <b>Conslusion générale</b>	 <b>181</b>
 <b>V. Experimental part</b>	 <b>187</b>
<b>V.1 Solvents, reagents and apparatus</b>	<b>189</b>
V.1.1 Solvents	189
V.1.2 Reagents	189
V.1.3 Enzymes	190
V.1.4 Apparatus	190
<b>V.2 Synthesis</b>	<b>191</b>
V.2.1 Synthesis of 1-(11-iodoundecyl)-1H-pyrrole	191
V.2.2 Synthesis of 4-(4-(1H-pyrrol-1-yl)butyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine	191
V.2.3 Synthesis of 4-(12-(1H-pyrrol-1-yl)dodecyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine	192
V.2.4 Synthesis of [bis((1,10-phenanthroline-5,6-dione)(4-(4-(1H-pyrrol-1-yl)butyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine)Ru <sup>II</sup> )](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> [Ru <sup>II</sup> (PhQ) <sub>2</sub> (Bpy-pyrrole)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	192
V.2.5 Synthesis of [bis((1,10-phenanthroline-5,6-dione)( 4-(12-(1H-pyrrol-1-yl)dodecyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine)Ru <sup>II</sup> )](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> [Ru <sup>II</sup> (PhQ) <sub>2</sub> (Bpy-pyrrole)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	193
V.2.6 Synthesis of 2-((11-(1H-pyrrol-1-yl)undecyl)oxy)naphthalene-1,4-dione	193
V.2.7 Synthesis of 1-(4-bromobutyl)pyrene	194
V.2.8 Synthesis of 4,4'-bis(4-(pyren-1-yl)butoxy)-2,2'-bipyridine	194
V.2.9 Synthesis of [(1,10-phenanthroline-5,6-dione) <sub>2</sub> ((4,4'-bis(4-pyrenyl-1-ylbutoxy)-2,2'-bipyridine)Ru <sup>II</sup> )](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> (RuQ-pyrene)	195
<b>V.3 Fabrication of the electrodes</b>	<b>195</b>

V.3.1	Fabrication of the nanostructured MWCNTs and DWCNTs pellets	195
V.3.2	Fabrication of the electrode by MWCNTs film transfer	196
V.3.3	Fabrication of the electrode by drop casting of a MWCNTs dispersion on GC electrode	197
V.3.4	Fabrication of the electrode by drop casting of a MWCNTs dispersion on carbon cloth electrode	198

<b>Liste des abréviations</b>	<b>201</b>
-------------------------------	------------

<b>Liste des publications</b>	<b>205</b>
-------------------------------	------------



# **Introduction Générale**





La constante augmentation des demandes énergétiques liées au développement industriel de nombreux pays ainsi qu'à l'explosion du marché de l'électronique embarqué conduit actuellement la société à faire face à de nombreux problèmes environnementaux et sanitaires. En effet, la diminution des ressources fossiles, les plus largement employées, rend impératif le développement de nouvelles sources d'énergies renouvelables et non polluantes.

Parmi les alternatives proposées depuis plusieurs années, les piles à combustibles sont particulièrement en vue pour la génération d'électricité verte. Ces piles, en particulier dihydrogène/dioxygène, sont destinées, à terme, à remplacer de nombreux générateurs d'énergie basés sur la combustion par exemple. Ce domaine est activement étudié et la thématique s'est aujourd'hui élargie à la production d'énergie par d'autres types de piles : les biopiles à combustible. Ces dernières sont basées sur la conversion de l'énergie chimique en énergie électrique par l'utilisation de catalyseurs biologiques (enzymes rédox, mitochondries, microbes). Evidemment, à l'heure actuelle, leurs applications ne sont pas destinées à remplacer les générateurs d'énergies les plus puissants mais à alimenter de petits dispositifs spécifiques. En revanche, grâce à la grande variété de biocatalyseurs existants, les biopiles permettent l'utilisation d'une large variété de combustibles ce qui les rend particulièrement attrayantes dans de nombreux secteurs liés aux biotechnologies. Chaque type de biopile peut être adapté, en fonction du matériel biologique utilisé et du rapport puissance/volume, à l'application envisagée.

Au sein de cette famille des biopiles à combustibles, les biopiles enzymatique ont reçues une attention toute particulière ces dernières années. Les développements de la bioélectrochimie et plus précisément dans le domaine des biocapteurs enzymatiques ont largement contribué à cet essor.

Les applications potentielles des biopiles enzymatiques sont là aussi très variées, de l'alimentation de petits dispositifs électroniques embarqués à l'application dans le domaine biomédical. En relation directe avec ce dernier, la recherche de biopiles enzymatiques fonctionnant grâce à l'énergie chimique du vivant représente désormais un véritable défi. A ce titre, les biopiles enzymatiques utilisant le glucose comme combustible et le dioxygène comme oxydant sont particulièrement en vue pour permettre un jour l'alimentation de dispositifs médicaux comme des pacemakers ou des organes artificiels par l'utilisation directe des ressources renouvelables (en glucose et  $O_2$ ) du patient de manière permanente. Ces dispositifs pourraient alors par exemple remplacer les batteries classiques, à durée de vie finie, utilisées dans ces applications et qui nécessitent des interventions chirurgicales coûteuses et lourdes pour le patient. Cet objectif implique évidemment que la biopile soit suffisamment stable et puissante pendant plusieurs années. C'est à ce niveau que se concentre aujourd'hui l'essentiel des recherches sur les biopiles enzymatiques glucose- $O_2$  pour l'implantable.

Pour optimiser ces « biodispositifs », de nombreux paramètres entrent en jeu. La pile doit permettre l'obtention d'une puissance maximale dans un volume minimal (le moins invasif possible). La pile doit également préserver une configuration idéale aux enzymes pour garantir

leur bonne activité bioélectrocatalytique ainsi que leur pérennité au fil du temps. Dans cette optique d'optimisation d'accès, de connexion de ces biocatalyseurs rédox dans un volume minimal et propice à l'activité de ce dernier, les nanotubes de carbone sont étudiés depuis maintenant quelques années pour leurs excellentes propriétés (grande surface spécifique, bonne conductivité et facilité de connexion d'enzymes rédox).

Dans ce contexte, ce travail de doctorat repose sur le développement de nouvelles architectures d'électrode à base de nanotubes de carbone pour l'optimisation du transfert électronique entre la protéine rédox et l'électrode : à l'anode pour l'oxydation du glucose ainsi qu'à la cathode pour la réduction du dioxygène. L'objectif de ces travaux est de surmonter les limitations en matière de puissance et de stabilité des biopiles glucose-O<sub>2</sub> pour permettre, à terme, leur bon fonctionnement *in vivo*. Il s'agit également de proposer de nouvelles bioélectrodes à base de nanotubes de carbone fonctionnalisés par des espèces rédox pour la bioélectrocatalyse.

Le premier chapitre constitue une étude bibliographique qui se scinde en trois sous parties. Dans la première, le contexte général de développement des biopiles à combustibles est présenté. Une revue plus précise des classes d'enzymes utilisées pour les réactions d'oxydation du glucose et de réduction de O<sub>2</sub> est détaillée. La deuxième partie se concentre sur les différentes méthodes d'immobilisation généralement employées pour greffer l'entité biologique à la surface d'une électrode. Les mécanismes de transfert électronique direct ou médié sont également présentés et détaillés plus précisément dans le cas des enzymes utilisées dans la conception de biopiles glucose-O<sub>2</sub>. Cette partie s'achève avec la présentation des nanotubes de carbone comme matériau adapté à l'immobilisation et à la connexion d'enzymes rédox. L'élaboration de biopiles glucose-O<sub>2</sub> à base de nanotubes de carbone est décrite suivie par les derniers résultats marquants d'implantations de biopiles opérationnelles dans des organismes vivants.

Le deuxième chapitre est consacré au développement et à la fabrication, par compression mécanique, de bioélectrodes nanostructurées pour l'élaboration de biopiles enzymatique glucose-O<sub>2</sub> puissantes en vue de l'implantation chez l'animal. La possibilité d'inclure une large quantité de biocatalyseurs (glucose oxydase, laccase, tyrosinase) dans un volume restreint est étudiée. Le chapitre conclut sur l'alimentation d'un petit dispositif électronique par la biopile en fonctionnement *in vitro* ainsi qu'une étude de stabilité dans le temps.

Le troisième chapitre se base sur la recherche d'une éventuelle alternative à l'anode pour l'oxydation du glucose. La glucose dehydrogenase remplace la glucose oxydase classiquement utilisée. Cette partie présente différentes méthodes de fonctionnalisation de matrices de nanotubes de carbone permettant l'immobilisation de la protéine et l'obtention de forts courants d'oxydation du glucose. Une biopile basée sur ce type de bioélectrode est alors présentée.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre est quant à lui consacré au développement d'une biocathode bienzymatique fonctionnelle en milieu physiologique, comme alternative aux cathodes basées sur la connexion des enzymes à cuivre. Dans cette partie, l'amélioration du transfert électronique de la HRP par modification non covalente des nanotubes de carbone est présentée. L'association de cette cathode avec l'anode présentée dans le chapitre précédent permet la réalisation d'une biopile originale en fin de chapitre.



## Chapitre 1

# I. Etude bibliographique

I.	Etude bibliographique .....	7
I.1	Les biopiles enzymatiques.....	9
I.1.1	Contexte général.....	9
I.1.2	Les biopiles à combustible .....	9
I.1.2.1	Principe d'une pile à combustible.....	9
I.1.2.2	Les biopiles à combustible.....	11
I.1.3	Les biopiles glucose-O <sub>2</sub> .....	17
I.1.3.1	Principe et applications .....	17
I.1.3.2	Les systèmes enzymatiques pour biopiles glucose-O <sub>2</sub> .....	19
I.2	Immobilisation et connexion enzymatique sur électrode .....	24
I.2.1	Généralités.....	24
I.2.2	Méthodes d'immobilisation de biomolécules .....	25
I.2.2.1	Principe .....	25
I.2.2.2	Adsorption.....	26
I.2.2.3	Réticulation .....	26
I.2.2.4	L'encapsulation.....	27
I.2.2.5	Assemblages supramoléculaires .....	28
I.2.2.6	Immobilisation par formation d'un lien covalent .....	29
I.2.3	Transfert électronique protéine-électrode .....	31
I.2.3.1	Transfert électronique direct/indirect.....	31
I.2.3.2	DET et MET à la biocathode pour la réduction de O <sub>2</sub> .....	33
I.2.3.3	DET et MET à la bioanode pour l'oxydation du glucose .....	37
I.3	Intégration des nanotubes de carbone dans les biopiles glucose-O <sub>2</sub> .....	41
I.3.1	Structures, propriétés et utilisations des nanotubes de carbone .....	41
I.3.1.1	Structures et propriétés .....	41
I.3.1.2	Les nanotubes de carbone comme matériau d'électrode .....	44

I.3.1.3	Modifications et fonctionnalisation des CNTs .....	45
I.3.2	Les CNTs pour l'immobilisation et la connexion d'enzymes rédox dans les biopiles glucose-O <sub>2</sub> pour l'implantable.....	50
I.3.2.1	Electrodes à base de CNTs pour la connexion enzymatique .....	50
I.3.2.2	Biopiles glucose-O <sub>2</sub> à base de CNTs .....	52
I.4	Implantations des biopiles glucose-O <sub>2</sub> .....	55

## I.1 Les biopiles enzymatiques

### I.1.1 Contexte général

La production d'énergie s'est longtemps reposée sur l'utilisation de ressources fossiles présentes et disponibles en quantité finie. Les hydrocarbures, le charbon ou encore le gaz naturel sont en effet les ressources les plus largement utilisées encore aujourd'hui pour produire de l'énergie. Cependant, l'augmentation de la population mondiale et la modernisation des sociétés a eu l'effet logique d'accroître les demandes en énergie et donc de consommation des ressources naturelles. En conséquence, leur quantité disponible diminue de manière exponentielle avec le temps. En outre, ces carburants fossiles, majoritairement constitués de carbone ont le désavantage de générer des gaz à effet de serre (GES) comme le  $\text{CO}_2$  lors de leur combustion. A ces combustibles, l'énergie nucléaire, également basée sur la fission de ressources fossiles semblait devenir une alternative tangible car ne générant pas de GES. En revanche, la problématique des déchets hautement toxiques produits par cette méthode n'a pour le moment pas de solution. Aussi, des événements récents ont mis en avant la dangerosité des systèmes d'exploitation de la fission nucléaire lors d'accidents dans des centrales et montré les conséquences humanitaires et écologiques désastreuses que pouvaient avoir ces dernières. C'est dans ce contexte que la recherche d'alternatives se développe depuis plusieurs dizaines d'années. Parmi ces dernières, les piles à combustibles sont particulièrement en vue pour remplacer un jour la combustion des ressources fossiles.

### I.1.2 Les biopiles à combustible

#### I.1.2.1 Principe d'une pile à combustible

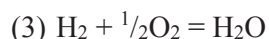
Une pile à combustible (PAC) est un dispositif capable de générer de l'énergie électrique à partir d'énergie chimique. Ce processus de conversion d'énergie se base sur la transformation électrochimique d'une substance chimique par des processus d'oxydation et de réduction. Plus précisément, les PACs reposent sur le simple principe de la circulation d'électrons entre une première électrode où se produit une réaction d'oxydation d'un substrat : l'anode, et une seconde, à laquelle une réaction de réduction d'un oxydant a lieu : la cathode. Les deux réactions, d'oxydation et de réduction, permettent alors la circulation d'électrons (ou courant électrique) lorsque les deux électrodes sont connectées par un circuit externe. Le combustible (à l'anode) et l'oxydant (à la cathode) doivent en permanence alimenter la pile pour pouvoir permettre l'obtention d'un courant électrique constant. Comme une batterie, une PAC permet donc l'obtention d'énergie électrique à partir d'une réaction chimique à l'électrode mais

possède l'avantage de pouvoir fonctionner à l'infini, en théorie, temps que le combustible et l'oxydant reste disponible<sup>1</sup>. De même, le matériau d'électrode doit être suffisamment stable pour perpétuer la réaction, idéalement, indéfiniment. Les avantages environnementaux d'utilisation de ces PACs sont nombreux, en particulier les produits des réactions chimiques sont souvent non polluants et l'efficacité énergétique de celles-ci est supérieure aux moteurs à combustion utilisant des carburants fossiles<sup>2</sup>.

Grove and Schoebein furent les auteurs de travaux pionniers dans le domaine des piles à combustibles. En 1839 ils réalisèrent les premières PACs à dihydrogène-dioxygène<sup>3,4</sup>. Ce système de pile H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> est aujourd'hui toujours particulièrement étudié. Dans ce cas, H<sub>2</sub> joue le rôle de carburant et est oxydé à l'anode pour produire des protons (H<sup>+</sup>) et O<sub>2</sub> est l'oxydant réduit à la cathode pour produire de l'eau (Figure I.1). La pile met donc en jeu deux demi-réactions rédox :



Globalement, la réaction de la pile peut alors s'écrire :



Des équations de demi réaction ressort que la différence de potentiel théorique maximale de la pile peut être de 1,229 V.

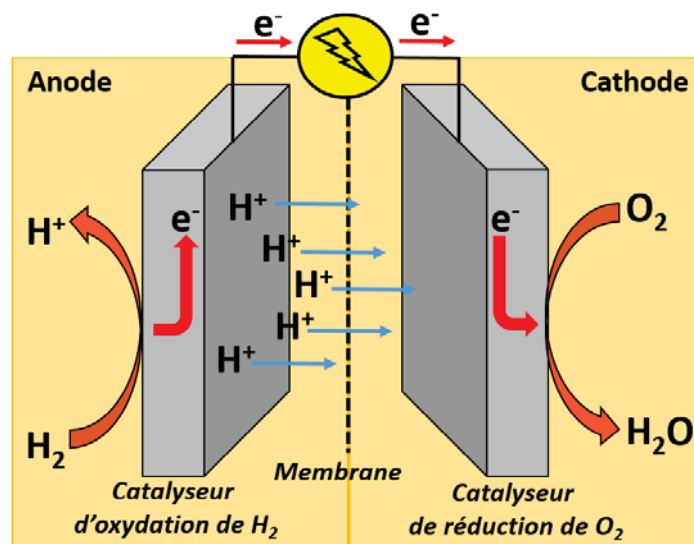


Figure I.1 : Schéma de principe d'une pile à combustible H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>

Une grande majorité des PACs H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> utilise des catalyseurs métalliques pour permettre les réactions d'oxydation et de réduction à l'anode et à la cathode<sup>5</sup>. Les puissances délivrées et le peu de déchets produits représentent les principaux avantages de ces dispositifs. Cependant, les



catalyseurs couramment utilisés aux électrodes, comme le platine par exemple, sont des matériaux particulièrement coûteux et limitent donc la fabrication et l'utilisation à grande échelle de ces PACs. Ces piles souffrent également d'empoisonnements relatifs à la présence d'espèces telles que CO, CO<sub>2</sub> ou encore Cl<sub>2</sub> qui diminuent les performances de la PAC dans le temps<sup>6,7</sup>. Pour contourner ces limitations, de nombreux travaux décrivent l'élaboration de nouveaux types d'architectures d'électrodes, améliorant ainsi les stabilités du dispositif et tentent de minimiser les quantités en catalyseurs utilisés dû à leur coût élevé<sup>8,9</sup>. Les limitations énoncées précédemment sont cependant de véritables freins à une commercialisation de grande échelle de ces PACs malgré leur développement.

Les métaux nobles, comme le platine par exemple, sont rares sur la planète et ceci explique leur prix élevé. Les catalyseurs naturels, les enzymes, sont des protéines capables de réaliser toutes sortes de réactions complexes tout en étant constituées d'atomes abondants, le squelette peptique est constitué à majorité de carbone, oxygène, azote pour la matière organique et un certain nombre d'entre elles utilisent des métaux non nobles particulièrement abondants comme le fer, le cuivre, le nickel, etc. Les enzymes rédox plus particulièrement représentent une importante proportion de ces biocatalyseurs. Elles réalisent une très grande variété de réaction d'oxydo-réduction sur de nombreux substrats naturels. Ce n'est qu'en 1964 que la démonstration de l'utilisation de ces enzymes rédox pour générer un courant électrique a été faite par Yahiro, Lee et Kimble<sup>10</sup>. Ils décrivent alors l'utilisation de glucose oxydase (GOx) et de D-amino acide oxydase afin d'obtenir un courant électrique. Ainsi la première « biopile » avait alors été décrite. Cependant, du fait des très faibles courants obtenus et de la durée de vie des enzymes en solution, ces recherches sont restées très minoritaires au profit des études menées sur les PACs « classiques » (abiotiques) produisant beaucoup plus de courant. Ce n'est que depuis une vingtaine d'années, avec l'essor de la technologie des biocapteurs et l'arrivée de nouveaux matériaux d'électrodes, que l'utilisation de ces biocatalyseurs se développe plus largement.

#### 1.1.2.2 Les biopiles à combustible

##### *1.1.2.2.1 Principe de fonctionnement d'une biopile*

De la même manière que les piles à combustibles abiotiques, les biopiles consistent en l'association de biocatalyseurs permettant d'effectuer une réaction d'oxydation d'un combustible (dihydrogène<sup>11,12</sup>, alcools<sup>13-15</sup>, glucose<sup>16,17</sup>...) à l'anode et la réduction d'un oxydant (majoritairement O<sub>2</sub>) à la cathode<sup>18</sup>. Plus précisément, on peut dire que l'électrode joue le rôle d'un des substrats naturels impliqué dans la réaction rédox en tant que donneur (biocathode) ou accepteur (bioanode) d'électrons (Figure I.2A). De nombreux avantages sont relatifs à l'utilisation de ce matériel biologique pour élaborer une pile. Leur structure est conçue

afin d'être spécifique de leur substrat et, ces protéines effectuent ces réactions rédox à des potentiels très proches des potentiels thermodynamiques. Les potentiels des deux électrodes sont alors fixés par la valeur des potentiels rédox mis en jeu dans la catalyse. Les courants mesurés pour chacune des bioélectrodes seront dépendants de l'activité du matériel biologique vis-à-vis d'un substrat donné et de nombreuses autres conditions (vitesses de transfert d'électron à l'interface, diffusions, température, salinité...) (Figure I.2B).

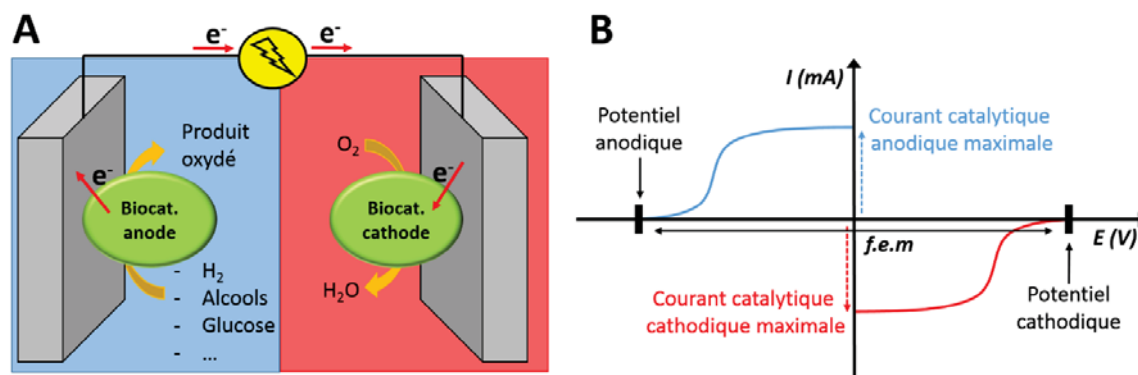


Figure I.2 : A) Schéma représentatif du fonctionnement d'une biopile à combustible B) Représentation sur diagramme potentiel-courant des contributions anodique et cathodique permettant l'obtention de la force électromotrice (f.e.m) de la biopile et des courants catalytiques

Les puissances obtenues à l'heure actuelle avec les biopiles ne permettent pas d'envisager l'alimentation électrique de dispositifs à haute demande énergétique. En effet, l'objectif de ces biopiles est de se substituer aux piles dites « classiques » et aux batteries utilisés pour des appareils à faibles demandes énergétiques tels que des petits appareils portables (téléphone portable, MP3) ou encore des dispositifs biomédicaux (capteurs à glucose, stimulateur cardiaque, etc) pour l'implantable. Pour toutes ces applications, il existe de nombreuses combinaisons possibles d'associations de biocatalyseurs. En effet, outre les protéines rédox, il existe dans la littérature un grand nombre d'exemples où le matériel biologique utilisé comme catalyseur peut également être une cellule (bactérie) ou encore une mitochondrie qui est connecté sur électrode. De même, l'association de différents types de bioélectrodes peut être envisagée.

#### I.1.2.2.2 Les biopiles microbiennes

Les piles à combustible microbiennes (PACMs) consistent en l'utilisation de micro-organismes (MOs) (bactéries ou levures) comme biocatalyseurs afin de réaliser l'oxydation de matière organique à l'anode et la réduction de O<sub>2</sub> à la cathode<sup>19-23</sup>. Dans ce type de biopile, le catalyseur est un organisme à part entière. Les colonies microbiennes forment à la surface de l'électrode un « biofilm » qui est capable de se régénérer théoriquement de manière continue en milieu propice à sa croissance, c'est-à-dire en présence de substrat. A l'anode donc, les bactéries vont se développer et permettre l'obtention de courants catalytiques directement imputable à la

consommation (ou l'oxydation) d'une très large variété de substrats organiques, différents selon les souches microbiennes présentes<sup>24</sup>. Grâce à sa propriété à se régénérer constamment et donc produire sa propre machinerie enzymatique, les biopiles microbiennes peuvent atteindre des durées de vie très longues de l'ordre de plusieurs années. En revanche, ces dispositifs délivrent bien souvent de faibles densités de puissance limitant leur utilisation. L'une des causes principales est le transport de matière qui n'est pas favorisé au sein du biofilm et donc limite les propriétés catalytiques de la bioélectrode. De plus, comme les MOs utilisés à l'anode sont souvent capables de venir se développer à la surface de la cathode, il est nécessaire d'élaborer une pile où les bioélectrodes sont compartimentées, sans quoi les performances de la biopile seront diminuées.

Jusqu'à très récemment, les cathodes utilisées dans ces PACMs étaient généralement constituées de platine ou utilisaient des catalyseurs moléculaires à base de porphyrines et phtalocyanine de cobalt pour permettre la réduction du dioxygène<sup>25,26</sup>. Ce n'est qu'en 2005 que l'équipe de A. Bergel a pu démontrer l'existence d'un biofilm marin capable de réduire O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O sur électrode d'acier inoxydable<sup>27</sup>. Dans cette étude l'anode utilisée était alors abiotique. Depuis, il existe plusieurs exemples de biopiles comprenant un biofilm comme biocatalyseurs à l'anode ainsi qu'à la cathode. Notamment, en 2008, Rabaey et al. ont décrit l'élaboration d'une PACM dont la cathode microbienne permettait de réduire efficacement O<sub>2</sub> en étant directement en contact avec l'air<sup>28</sup>. Cette électrode était capable de débiter 2,2 A.m<sup>-2</sup> et, en combinaison avec une anode également microbienne, la biopile délivrait alors une puissance de l'ordre de 0,3 W.m<sup>-2</sup>. Aussi, les auteurs ont pu isoler la population bactérienne dominante dans le biofilm et ainsi les sélectionner pour obtenir une bioélectrode améliorée pour la réduction de O<sub>2</sub>. Dans le but d'accroître les performances de la biocathode, des travaux présentent aussi l'utilisation de l'enzyme laccase pour la réduction du dioxygène<sup>29</sup>. L'utilisation de l'enzyme dans ce cas permet d'augmenter considérablement la différence de potentiel totale de la pile à 1,1 V et la puissance délivrée à environ 45 mW.m<sup>-2</sup>.

#### *1.1.2.2.3 Les biopiles à mitochondrie*

La grande majorité des biopiles décrites dans la littérature sont basées sur l'utilisation d'enzymes rédox ou de micro-organismes entiers. Il est possible de considérer les bioélectrodes à mitochondrie comme un compromis entre l'utilisation d'une protéine et d'une cellule. En effet, les mitochondries sont des organites présents chez les cellules eucaryotes dont le rôle physiologique est de stocker l'énergie à partir de petites molécules par la formation d'ATP (Adénosine TriPhosphate). Comme les MOs, elles possèdent leurs propres relais enzymatiques nécessaires à la transformation totale de substrat organique. L'avantage d'utiliser ces mitochondries provient donc de la possibilité de pouvoir collecter un plus grand nombre d'électrons lors de la réaction d'oxydation de différents types de substrats à la bioanode tout en

n'ayant pas de problème de diffusion observé lors de la formation d'un biofilm bactérien. En revanche, de la même manière que les protéines rédox, l'espèce doit être immobilisée sur l'électrode par diverses méthodes car, comme les enzymes, leur durée de vie en solution est limitée.

Ces systèmes ne sont étudiés pour l'élaboration de biopile que depuis très récemment et la plupart des résultats publiés concernant ce sujet proviennent de l'équipe de Minteer aux Etats-Unis. Les auteurs s'intéressent à l'oxydation totale de substrats biologiques tels que le pyruvate par ces organelles. Ils mettent en avant le fait que l'oxydation du glucose par la glucose oxydase (GOx) ou la glucose déshydrogénase (GDH) permet la collecte de seulement 2 électrons, alors que dans le cas de son oxydation totale en CO<sub>2</sub>, il est possible de récupérer 24 électrons grâce à la glycolyse et au cycle de Krebs réalisés au sein des mitochondrie. Le groupe a également prouvé la possibilité de transfert électronique entre l'électrode et l'organelle grâce la présence de protéine rédox membranaire comme la Cytochrome C oxydase<sup>30</sup>. En 2008, ils ont pu démontrer la possibilité de réaliser l'oxydation totale du pyruvate grâce à la présence de mitochondries immobilisées sur l'électrode et la formation d'une biopile à mitochondrie<sup>31,32</sup>. Afin d'élargir la gamme de substrats consommables par ces PACs mitochondriales, ce même groupe s'est penché sur l'oxydation d'acides gras et d'acides aminés pour la génération d'un courant anodique<sup>33</sup>. En couplant une cathode de platine en contact avec l'air et utilisant une anode oxydant la cystéine, ils ont obtenus des densités de puissances de l'ordre de 10  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

#### *1.1.2.2.4 Les biopiles enzymatiques*

Les biopiles à combustible enzymatiques sont parmi les plus étudiées à ce jour avec les piles microbiennes<sup>2,34-36</sup>. Les densités de courants et de puissances obtenues grâce à l'utilisation de ces protéines rédox sont bien souvent supérieures à celles obtenues dans le cadre des PACMs. Dans le cas de ces bioélectrodes, la diffusion des substrats est facilitée par rapport aux électrodes à MOs par exemple, dû à l'absence de biofilm et de membrane cellulaire. En outre, les enzymes sont spécifiques de leurs substrats, ce qui permet de s'affranchir de membrane séparatrice entre les deux bioélectrodes, à l'inverse des autres types de piles à combustibles. En revanche, une importante limitation provient du non renouvellement de la charge en biocatalyseur au sein de la bioélectrode qui possède une stabilité dans le temps limité.

Pour cette raison, tout comme les PACMs, les performances de biopiles enzymatiques (densité de courant, stabilité) restent pour le moment inférieures aux PACs classiques et ont ralenti leur développement. Cependant, depuis une dizaine d'années, le nombre de travaux décrivant l'élaboration de biopiles enzymatiques n'a cessé de croître. Cette tendance s'explique par le développement en parallèle des biocapteurs enzymatiques. L'auto-alimentation de biocapteurs, où l'analyte et le carburant sont la même molécule a permis de passer de la simple détection à

la détection couplé à la conversion d'énergie<sup>37,38</sup>. L'objectif de ces biopiles enzymatiques est de pouvoir fournir de l'énergie à de petits dispositifs à faible demande énergétiques pour l'implantable ou encore l'électronique nomade<sup>39,40</sup>.

Dans toutes ces biopiles enzymatiques, les protéines utilisées sont des oxydoréductases. Elles sont capables de catalyser une réaction chimique, d'oxydation ou de réduction, faisant intervenir le transfert d'un certain nombre d'électrons.

Il existe donc un certain nombre de protéines rédox étant capables de réaliser la réaction d'oxydation d'une grande variété de combustibles à l'anode et la réduction d'un oxydant à la cathode.

#### - Les enzymes et oxydants pour la biocathode

Comme les PACs classiques, la majorité des biopiles enzymatiques sont basées sur la réduction bioélectrocatalytique du dioxygène. Les enzymes rédox utilisées pour la réduction à 4 électrons de  $O_2$  en  $H_2O$  sont pour la plupart des enzymes dites à cuivre (ou MultiCopperOxidase, MCOs en anglais). La réduction prend place au sein du site actif métallique comprenant plusieurs atomes de cuivre<sup>41</sup>. La laccase<sup>42</sup> et la bilirubine oxydase<sup>43</sup> sont de loin les plus largement utilisées aux biocathodes enzymatiques. Il existe aussi des exemples de biocathode incorporant la polyphénol oxydase (PPO ou Tyrosinase)<sup>44</sup> ou encore la cytochrome oxydase (Cyt Ox)<sup>45</sup>.

Le peroxyde d'hydrogène a également été utilisé à la cathode. Dans ce cas, la réduction de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  ne fait intervenir que 2 électrons. Les enzymes permettant son électroréduction font partie de la classe des peroxydases et sont composées d'un atome de fer, souvent coordonné à un hème, comme site catalytique.

Les différents systèmes enzymes/oxydants sont résumés dans le Tableau 1 avec les demi-réactions rédox mises en jeu dans le processus catalytique.

Oxydant	Enzymes	Métal	Demi-réaction
$O_2$	Laccase (Lac)	Cu	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$
	Bilirubine Oxydase (BOD)	Cu	
	Polyphénol Oxydase (PPO)	Cu	
	Cytochrome Oxydase (Cyt Ox)	Cu/Fe/hème	
$H_2O_2$	Horseradish peroxydase (HRP)	Fe/hème	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$

Tableau 1 : couples oxydant/enzymes majoritairement utilisés dans la conception de cathode pour les biopiles enzymatiques

#### - Les enzymes et combustibles pour la bioanode

L'un des intérêts des biopiles enzymatiques est de pouvoir utiliser un grand nombre de combustibles à oxyder pour la collecte d'électrons à l'anode. Les systèmes enzymatiques varient donc en fonction du carburant choisi à la bioanode. Cela ouvre de nombreuses alternatives selon les applications visées par les biopiles enzymatiques.

Comme pour les PACs, le dihydrogène demeure le combustible le plus attractif. Dans la nature, les systèmes protéiques responsables de catalyse réversible des protons en  $H_2$  sont les hydrogénases<sup>11</sup>. Ces enzymes sont capables d'oxyder  $H_2$  à de très faibles surtensions. Comme les MCOs, les hydrogénases sont des métalloenzymes composées de centres Fer-Fer ou Fer-Nickel capable de réduire les protons ou d'oxyder  $H_2$ . La force électromotrice d'une biopile composée d'une bioanode à  $H_2$  et d'une biocathode à MCOs serait proche de celle observée pour les PACs  $H_2/O_2$ . Cependant, ces protéines présentent souvent le désavantage d'être désactivées totalement en présence de monoxyde de carbone et surtout en présence de dioxygène<sup>46</sup>. De nombreuses équipes travaillent désormais sur l'utilisation d'hydrogénase tolérante à  $O_2$  pour contourner ces limitations<sup>47,48</sup>. Grâce à ces développements, des biopiles permettant l'obtention de forts voltages ont pu être élaborées<sup>49-51</sup>.

De nombreux combustibles, autres que  $H_2$ , peuvent également être utilisés à la bioanode. Les alcools (méthanol, éthanol, glycérol), les oligosaccharides (lactose, cellobiose, maltose, trehalose) ou les monosaccharides (glucose, mannose, fructose) sont autant de possibilités à exploiter pour collecter des électrons à l'anode par le biais de la connexion d'enzymes adéquates. Une liste représentative mais non exhaustive des enzymes utilisées pour oxyder ces substrats est présentée dans le Tableau 2.

combustible	Enzymes	Cofacteur	Demi-réaction
hydrogène	Hydrogénase ( $H_2$ ase)	Fe/Fe ou Ni/Fe	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$
Cellobiose	Cellobiose déshydrogénase (CDH)	FAD/hème	Lactose $\rightarrow$ lactone
Glucose	Glucose oxydase (GOx)	FAD	D-Glucose $\rightarrow$ acide
	Glucose déshydrogénase	$NAD^+$ ou PQQ	gluconique
Fructose	Fructose déshydrogénase (FDH)	FAD/hème	D-Fructose $\rightarrow$ 5-céto-fructose
Ethanol Méthanol	Alcool DH (ADH)	$NAD^+$	Alcool $\rightarrow$ aldéhyde
Aldéhydes	Aldéhyde DH (AIDH)	$NAD^+$	Aldéhyde $\rightarrow$ acide
Acides	Formate DH	$NAD^+$	Ac Formique $\rightarrow CO_2$

Tableau 2 : Principales enzymes utilisées à l'anode de biopiles enzymatiques

#### *1.1.2.2.5 Les biopiles hybrides et à base de catalyseurs moléculaires et bio-inspirés*

De nombreux travaux ont pu décrire l'élaboration de dispositifs alternatifs à l'utilisation de seules protéines pour la catalyse de substrats biologiques à l'anode et/ou à la cathode. Les combinaisons peuvent être très variées. Par exemple, une des deux bioélectrodes de la biopile peut être remplacée par une électrode abiotique pour former une pile dite « hybride ». L'électrode abiotique peut, dans ce cas, être métallique ou modifiée par un catalyseur moléculaire. On retrouve de nombreux exemples de ce type d'applications, démontrant la possibilité de substituer la bioanode ou la biocathode par une électrode sans matériel biologique. Un groupe a notamment démontré l'intérêt d'intervertir une bioanode à glucose avec une anode  $\text{Zn}/\text{Zn}^{2+}$ . Couplé avec la réduction électroenzymatique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou la réduction de  $\text{O}_2$  à la cathode, les anodes à zinc permettent l'obtention de voltages de piles particulièrement élevés, jusqu'à 1,76 V avec des puissances de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$  <sup>52,53</sup>. De même, il est possible de conserver la bioanode et d'utiliser une cathode non enzymatique. Il existe de nombreux exemples utilisant le platine à la cathode pour la réduction du dioxygène.

Une autre alternative consiste à retirer le matériel biologique aux deux électrodes pour le remplacer par des catalyseurs moléculaires qui peuvent être parfois bio-inspirés des enzymes rédox pour former une pile totalement abiotique pour l'oxydation de combustibles biodisponibles et la réduction de  $\text{O}_2$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces piles utilisent comme catalyseurs des complexes métalliques qui peuvent avoir une structure très similaire à des sites actifs de métalloenzymes, comme des porphyrines de fer ou phtalocyanine de cobalt, ou alors des structures totalement différentes. Elouarzaki et al. ont récemment démontrés la possibilité d'oxyder le glucose à l'anode grâce à une porphyrine de rhodium et de réduire  $\text{O}_2$  à la cathode grâce à un phtalocyanine de cobalt<sup>54</sup>. Les performances de ces piles sont proches de celles des biopiles enzymatiques, de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$  mais leur inconvénient majeur est de n'être opérationnelles qu'en condition de pH extrêmes.

### **1.1.3 Les biopiles glucose- $\text{O}_2$**

#### **1.1.3.1 Principe et applications**

Les biopiles glucose- $\text{O}_2$  sont parmi les systèmes de piles enzymatiques les plus étudiés à l'heure actuelle. Elles sont basées sur l'oxydation du D-glucose à l'anode et la réduction du dioxygène à la cathode. Leur attractivité provient du fait que les deux substrats utilisés sont présents dans de nombreux milieux physiologiques animaux et végétaux<sup>55</sup>. En effet, le glucose et  $\text{O}_2$  sont présents en concentrations normalement régulées et sans cesse renouvelées. Ceci rend donc possible la conversion de l'énergie chimique présente chez un animal en énergie électrique. La



génération *in vivo* d'un courant électrique ouvre alors la voie à de nombreuses applications désormais envisageables dans le secteur biomédical<sup>56,57</sup>. L'objectif visé par cette technologie se concentre principalement sur l'alimentation de dispositifs implantables dit à « faibles » demandes énergétiques comme des pacemakers, des organes artificiels (sphincter, reins) ou encore des capteurs autoalimentés pour la détection de la glycémie par exemple. Grâce au constant renouvellement des substrats en milieu biologique, l'utilisation de la pile doit permettre l'obtention de puissances suffisantes pour alimenter, en continu ou ponctuellement, des circuits électriques adaptés aux différents types de dispositifs. Les puissances nécessaires peuvent varier de la dizaine de  $\mu\text{W}$  pour un pacemaker par exemple au mW voir la dizaine de mW pour l'alimentation de dispositifs plus exigeants (sphincter artificiel, pompe à insuline, rein artificiel).

Jusqu'à très récemment, un nombre important de travaux se focalisaient sur l'expérimentation en milieu proche du physiologique, mais *in vitro* ou chez les végétaux, dû à la difficulté des manipulations d'implantation chez l'animal. Ces dernières années, de nombreuses contributions ont permis de lever des verrous technologiques. Notamment, N. Mano et al. ont décrit en 2003 une des premières biopiles glucose- $\text{O}_2$  fonctionnant dans un grain de raisin et délivrant une puissance de l'ordre de quelques  $\mu\text{W}$  (Figure I.3A)<sup>58</sup>. Depuis, de nombreuses expérimentations présentent l'alimentation de dispositifs par des biopiles glucose- $\text{O}_2$ . En 2008, le groupe de Kano a par exemple publié une biopile enzymatique qui, utilisée en série, a été capable de générer suffisamment d'énergie pour faire fonctionner un lecteur mp3 et une petite voiture radiocommandée (Figure I.3B)<sup>16</sup>.

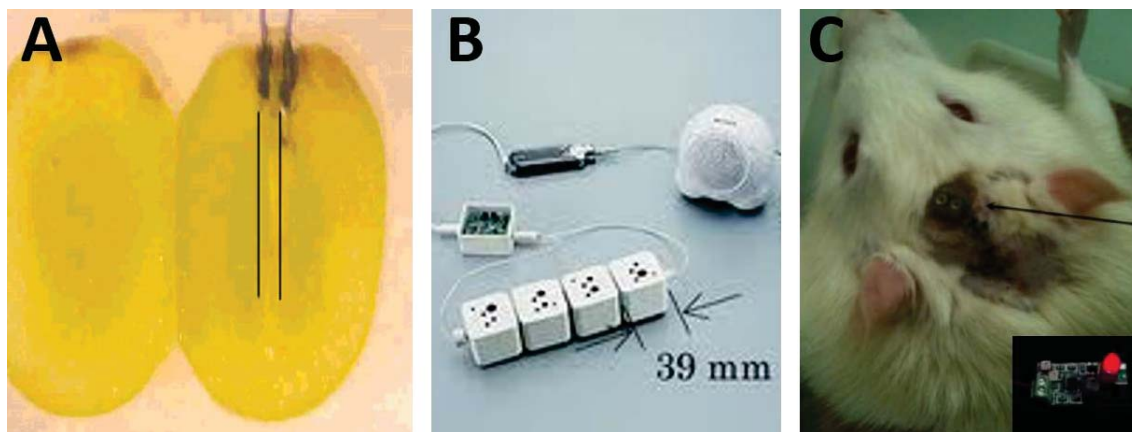


Figure I.3 : A) Biopile glucose- $\text{O}_2$  opérationnelle dans un grain de raisin<sup>58</sup> B) Biopile glucose- $\text{O}_2$  alimentant un lecteur MP3<sup>16</sup> C) biopile glucose- $\text{O}_2$  implantée dans un rat et permettant l'alimentation d'une diode électroluminescente<sup>59</sup>

Les premiers résultats probants décrivant les implantations de biopiles glucose- $\text{O}_2$  dans des animaux ont surtout été obtenus au cours des cinq dernières années. Notamment, un des résultats les plus marquants a été réalisé par Zebda et al. où une biopile implantée dans un rat a permis l'alimentation d'une diode électroluminescente (Figure I.3 C)<sup>59</sup>.



Tous ces travaux ont pu démontrer la faisabilité du principe de la biopile à glucose pouvant convertir de l'énergie chimique, à partir d'organismes vivants, en courant électrique. Pour autant, beaucoup reste à faire pour espérer un jour voir une de ces biopiles fonctionner dans un corps humain à des fins biomédicales. Des efforts sont à faire concernant la biocompatibilité, la stabilité et la puissance de ces biopiles glucose-O<sub>2</sub>. Ces deux derniers paramètres dépendent grandement des systèmes enzymatiques et des architectures d'électrodes envisagées.

#### I.1.3.2 Les systèmes enzymatiques pour biopiles glucose-O<sub>2</sub>

##### *I.1.3.2.1 Enzymes pour la réduction de O<sub>2</sub> à la biocathode*

Dans le cas des biopiles enzymatiques glucose-O<sub>2</sub>, la biocathode (électrode positive) est en général composée d'enzymes capables de réduire le dioxygène et ainsi réinjecter les électrons collectés à l'anode lors de l'oxydation du glucose. Ces enzymes sont pour la plupart des oxydases, elles catalysent l'oxydation de leur substrat naturel en utilisant O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons. L'idée pour la biocathode enzymatique est donc de substituer le substrat naturel par l'électrode. Comme à la bioanode, il existe différentes protéines capables de réaliser cette réaction de réduction bioélectroenzymatique du dioxygène à l'électrode. Les plus connues sont les MCOs. La plupart des travaux décrit concernant l'élaboration de biocathodes à O<sub>2</sub> font intervenir la laccase (Lac), la bilirubine oxydase (BOD) et plus récemment, la polyphénol oxydase (PPO, ou tyrosinase)<sup>44</sup> qui sont toutes des métalloenzymes à cuivre. La catalyse de réduction de O<sub>2</sub> par la PPO sera détaillée plus précisément dans le chapitre 2. Un autre système, récemment décrit, utilisant la peroxydase de radis noir (Horseradish peroxydase, HRP en anglais) pour réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par la GOx consécutivement à l'oxydation du glucose sera présenté plus en détail dans le chapitre 3.

##### *- La laccase (Lac)*

La laccase, comme toute les MCOs, utilisent le dioxygène comme accepteur d'électrons dans leur réaction de catalyse d'oxydation de ses substrats<sup>41</sup>. Lors de cette réaction d'oxydation, la Lac réduit consécutivement O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O par un mécanisme impliquant 4 protons et 4 électrons. Elle comporte plusieurs cations Cu<sup>2+</sup> dans différents sites<sup>60</sup>. On distingue un site mononucléaire (T1) et un site trinuéaire (T2/T3) étant le siège de la réduction du dioxygène (Figure I.4)<sup>61</sup>.

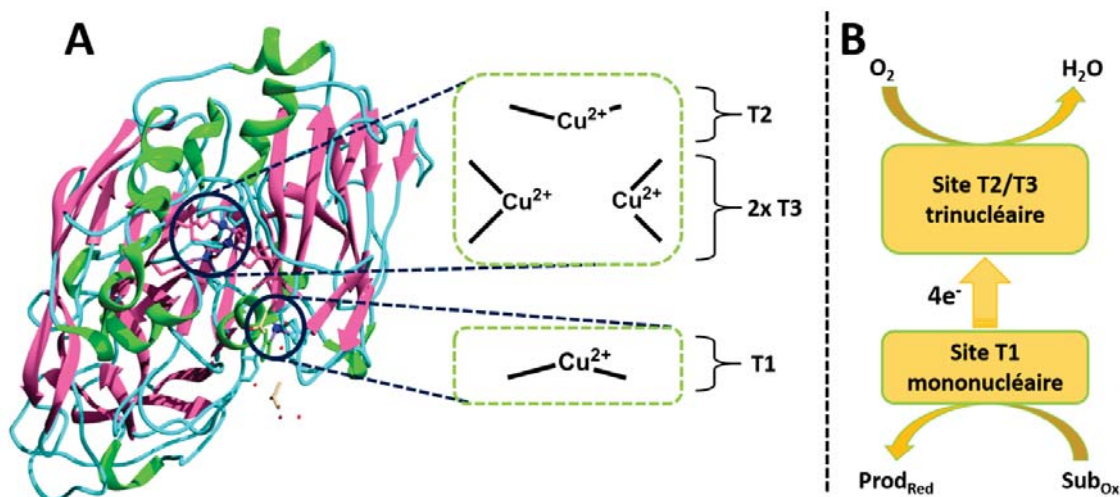


Figure 1.4 : A) Structure de la Lac avec les sites cuivre T1 et T2/T3 B) Schéma du transfert électronique du site T1 à T2/T3 permettant la réduction de O<sub>2</sub> au site trinuécléaire

La capacité de la Lac à pouvoir réduire O<sub>2</sub> bioélectrocatalytiquement est connue depuis plusieurs dizaines d'années déjà<sup>62</sup>. Lors de ce processus, les électrons provenant naturellement du substrat sont substitués par l'électrode pour permettre la bioélectroréduction de O<sub>2</sub> par la métalloenzyme. Cette protéine est capable de réduire le dioxygène avec une très faible surtension (quelques dizaines de mV). Le potentiel rédox du site T1, auquel les électrons sont transférés se trouve autour de 0,6 V Vs Ag/AgCl<sup>63</sup>. Pour toutes ces raisons, cette enzyme est abondamment utilisées dans de nombreuses applications biotechnologiques et à la cathode de nombreuses biopiles glucose-O<sub>2</sub><sup>64,65</sup>. Cependant, le fait que cette enzyme soit acidophile (peu active à pH neutre) et inhibée en présence d'ions Cl<sup>-</sup> la rend beaucoup moins attractive dans le cadre d'élaboration de biopiles glucose-O<sub>2</sub> pour l'implantable (pH 7,4 et [Cl<sup>-</sup>] = 150 mM).

#### - La bilirubine oxydase (BOD)

Comme la Lac, la BOD est une MCO. Elle est du même type et comporte donc les mêmes sites catalytiques, un site T1 et un site T2/T3<sup>66</sup>. Elle oxyde naturellement la bilirubine, son substrat avec la réduction concomitante du dioxygène. Elle est, comme la laccase, fréquemment utilisée dans la conception de bioanode pour biopile glucose-O<sub>2</sub><sup>67</sup>. De plus, elle présente l'avantage de ne pas être inhibée par les Cl<sup>-</sup> et est active en condition physiologique à pH neutre. Son seul inconvénient reste d'être désactivé par la présence de produits de dégradation de l'urate<sup>68</sup>. Néanmoins, Edembe et al. ont récemment publié une étude présentant une BOD (de *Bacillus pumillus*) présentant une très bonne activité catalytique de réduction de O<sub>2</sub> dans du sérum physiologique<sup>69</sup>.

### 1.1.3.2.2 Enzymes pour l'oxydation du glucose à la bioanode

La bioanode est le siège de la réaction d'oxydation du combustible. Dans le cadre d'une anode enzymatique, les électrons sont collectés par la protéine et doivent ensuite être transférés à l'électrode pour se rendre jusqu'à la cathode où la réaction de réduction de l'oxydant sera effectué par une autre enzyme. Pour développer des biopile glucose- $O_2$  il existe un certain nombre d'enzymes capables d'oxyder le glucose par un processus à deux électrons. Les plus largement utilisées sont la glucose oxydase (GOx), la glucose déshydrogénase (GDH), la cellobiose déshydrogénase (CDH), la pyranose déshydrogénase (PyDH) ou encore la pyranose oxydase (PyOx).

#### - La glucose oxydase (GOx)

La glucose oxydase est probablement l'enzyme la plus utilisée pour l'oxydation du glucose à l'anode des biopiles glucose- $O_2$ . L'une des raisons principales découle du développement des biocapteurs métaboliques à glucose depuis plusieurs dizaines d'années dans lesquels la GOx a été très largement employée<sup>70,71</sup>. Cette enzyme est constituée de deux sous unités identiques (homodimère) à l'intérieur desquels est enfoui le cofacteur organique rédox responsable de l'oxydation du glucose : la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) (Figure I.5)<sup>72</sup>.

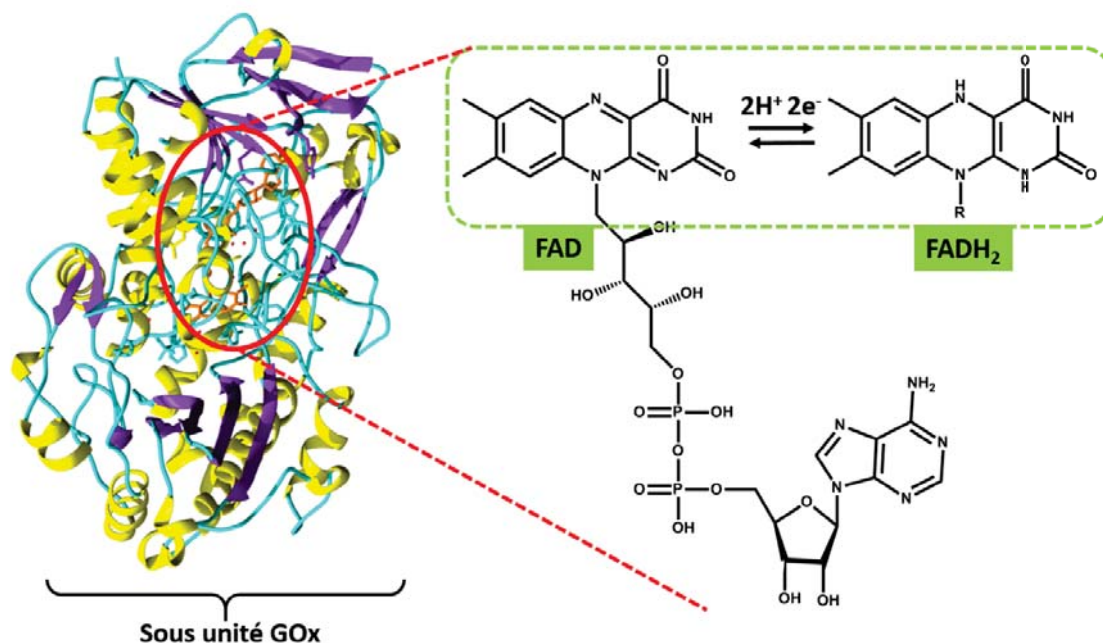


Figure I.5 : Schéma d'une sous unité constituant le dimère de la GOx contenant le cofacteur organique rédox FAD, formant le couple FAD/FADH<sub>2</sub>

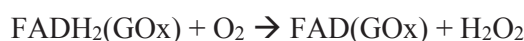
La GOx présente une très forte sélectivité pour le  $\beta$ -D-glucose (par rapport au  $\alpha$ -D-glucose). Grâce à son cofacteur organique rédox et l'environnement protéique de ce dernier, la GOx

réalise, par un processus à  $2e^-$  et  $2H^+$ , l'oxydation du glucose en gluconolactone, qui s'hydrolyse spontanément en acide gluconique:



Cette protéine a également l'avantage d'être particulièrement active dans les conditions physiologiques ( $37^\circ\text{C}$  et  $\text{pH } 7,4$ ) ce qui en fait une excellente candidate pour l'élaboration d'anode pour biopile glucose- $\text{O}_2$  pour les applications implantables.

En revanche, l'accepteur d'électrons naturel de la forme réduite ( $\text{FADH}_2$ ) de l'enzyme est le dioxygène<sup>73</sup>. Cette réaction limite donc la possibilité de transfert électronique entre la protéine rédox et l'électrode. En outre, cette réaction entraîne la formation de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) qui est un oxydant fort :



La stabilité de la GOx lui est conférée par l'enfouissement du cofacteur organique rédox profondément à l'intérieur de l'enveloppe protéique de l'enzyme et par son degré de glycosylation élevé (de 16% à 25% de son poids moléculaire)<sup>74</sup>.

#### - Les glucose déshydrogénases (GDH)

Comme la GOx, les GDH sont capables de réaliser l'oxydation du glucose en acide gluconique. Il existe trois grandes classes de GDH :

- Les GDH Nicotinamide Adénine Dinucléotide dépendantes (GDH  $\text{NAD}^+$ -dépendantes)
- Les GDH PyrroloQuinoline Quinone (GDH PQQ-dépendantes)
- Les GDH Flavine Adénine Dinucléotide (GDH FAD-dépendantes)

Toutes ont pour avantage, par rapport à la GOx de ne pas utiliser  $\text{O}_2$  comme accepteur électronique naturel.

Les GDH  $\text{NAD}^+$ -dépendantes utilisent un cofacteur dit « labile », c'est-à-dire qui n'est pas lié fortement au site actif de l'enzyme. L'utilisation de ces GDH  $\text{NAD}^+$ -dépendantes et la régénération du cofacteur est décrite plus en détail dans le chapitre 3.

Les GDH PQQ-dépendantes se présentent, comme la GOx, sous la forme d'un homodimère. Celui-ci contient un cofacteur organique de type quinone (pyrroloquinoline quinone) et trois cations calcium par sous unité<sup>75</sup>. Ces cations ont à la fois un rôle structural (formation du dimère) et fonctionnel puisque un cation calcium est impliqué dans la catalyse d'oxydation du glucose par PQQ (Figure I.6).

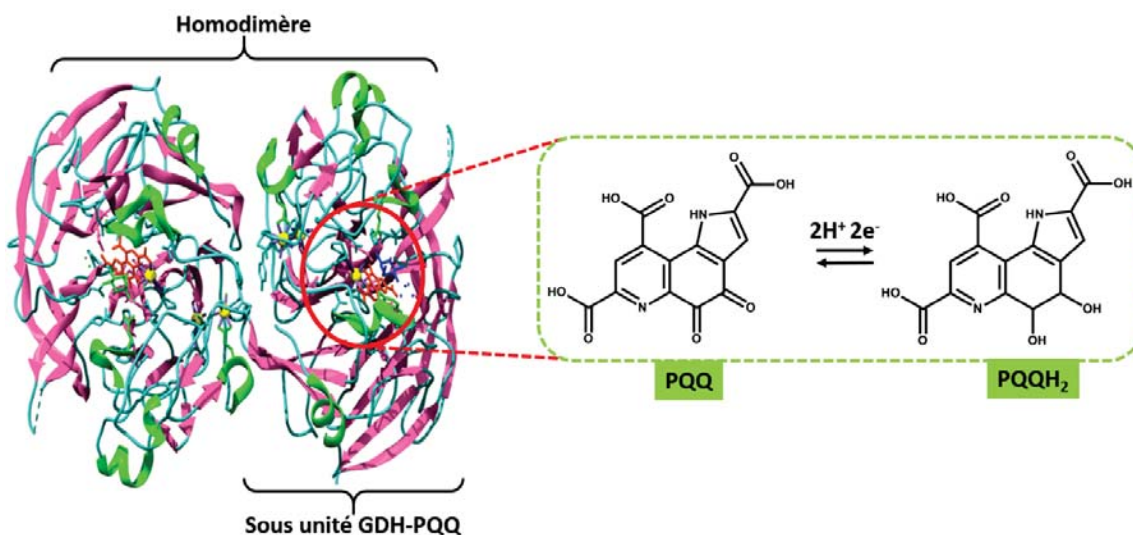


Figure I.6 : Structure de la GDH PQQ-dépendante et forme oxydé et réduite du couple PQQ/PQQH<sub>2</sub>

On retrouve un bon nombre de contributions faisant état de l'utilisation de la GDH PQQ-dépendante à l'anode de biopiles glucose-O<sub>2</sub> fonctionnelles<sup>76-78</sup>.

Une autre classe de GDH, les GDH FAD-dépendantes, est pourvue du même type de cofacteur organique rédox que le GOx : une FAD. Cependant, tout comme les GDH-PQQ et NAD<sup>+</sup>-dépendantes le dioxygène n'est pas l'accepteur d'électrons dans leur cycle catalytique. En plus de cet avantage, elles présentent des activités vis à de l'oxydation du glucose particulièrement intéressante pour la conception d'anode pour les biopile glucose-O<sub>2</sub>. Leur développement est d'ailleurs croissant<sup>79</sup>. Aussi, le potentiel rédox de la FAD étant inférieur à celui du cofacteur PQQ, elles permettraient d'obtenir des f.e.m de pile encore plus attractive que celles présentées dans les biopiles à base d'anode de GDH PQQ-dépendantes<sup>80</sup>.

#### - La cellobiose déshydrogénase (CDH)

La cellobiose déshydrogénase se présente sous la forme d'un monomère composé de deux domaines distincts. Un domaine contient une FAD, au même titre que la GOx ou les GDH FAD-dépendantes, et un autre domaine contient un hème (de type cytochrome)<sup>81</sup>. L'oxydation de l'unité saccharidique s'opère au niveau de la flavine et celle-ci est ensuite régénéré en transférant successivement les 2 électrons à l'hème (Figure I.7)<sup>82</sup>.



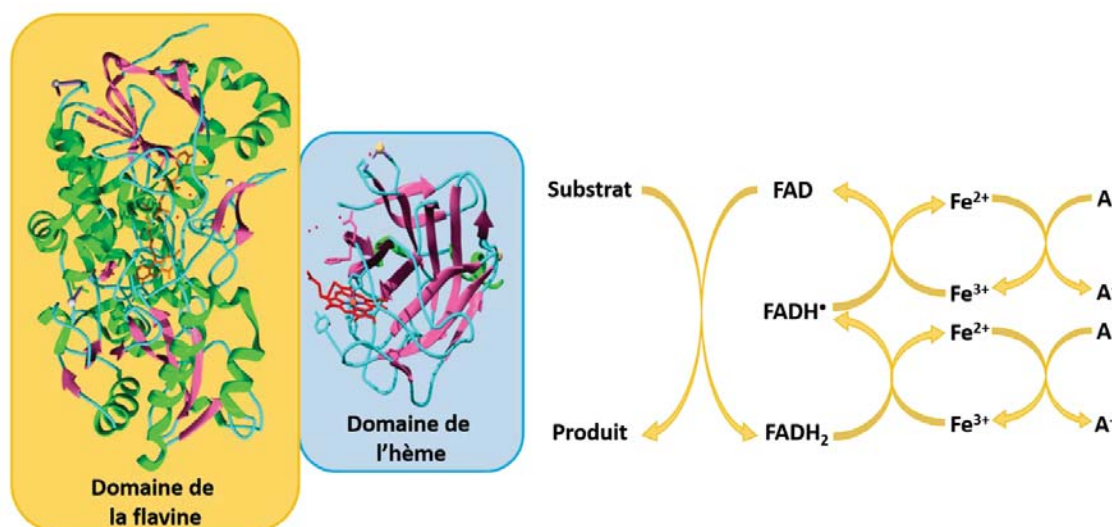


Figure 1.7 : structure des deux domaines flavine et hème responsable de la catalyse d'oxydation des dérivés saccharides et cycle catalytique mis en jeu

La CDH a pour particularité la possibilité d'oxyder différents types de résidus osidiques. En effet, elle est capable d'oxyder des disaccharides comme la cellobiose ou le lactose mais peut également dégrader les monosaccharides comme par exemple le glucose. Elle est donc également envisageable pour la conception d'anode pour biopile glucose-O<sub>2</sub><sup>83</sup>.

- Pyranose oxydase (PyOx) et deshydrogénase (PDH)

La pyranose oxydase est une protéine à poids moléculaire relativement élevé (300 KDa). Comme la GOx, elle comporte une flavine comme cofacteur organique. Son avantage majeur par rapport à la GOx est qu'elle n'est pas sélective de la forme  $\alpha$  ou  $\beta$ <sup>84</sup>. Elle pourrait donc être envisagée comme remplacement de la GOx dans certaine application en biotechnologie. En revanche, son accepteur naturel électronique est également le dioxygène. Dans ce contexte, la pyranose déshydrogénase peut s'avérer une excellente alternative puisqu'elle n'est pas régénérée par O<sub>2</sub>. L'accepteur physiologique de la PDH n'est d'ailleurs toujours pas connu<sup>85</sup>. La PDH a d'ores-et-déjà été étudiée dans des anodes pour biopiles glucose-O<sub>2</sub><sup>86,87</sup>.

## 1.2 Immobilisation et connexion enzymatique sur électrode

### 1.2.1 Généralités

Les biopiles enzymatiques sont donc basées sur l'utilisation de la biocatalyse. Une réaction d'oxydation est réalisée à l'anode et une réaction de réduction à la cathode. Pour permettre la

génération d'un courant électrique à partir de ces deux réactions, les électrodes doivent se substituer au cosubstrat de l'enzyme pour pouvoir collecter les électrons à l'anode et les distribuer à la cathode.

Depuis les études pionnières réalisées depuis les années soixante, la « bioélectrochimie » a permis de comprendre de nombreux phénomènes faisant intervenir les échanges entre protéines rédox et les électrodes<sup>88</sup>. Cette science a permis le développement de nouveaux outils pour la caractérisation de processus rédox biologiques et l'essor de nombreuses applications en biotechnologies (biocapteurs, biopiles, bioélectrocatalyseurs). Pour parvenir à étudier ces systèmes biologiques, l'interaction entre l'électrode et l'entité à étudier est d'une importance capitale. Dans les applications en biopiles et biocapteurs enzymatiques, une attention particulière est apportée à l'immobilisation de la protéine sur la surface. Cette étape n'est pas un procédé nouveau mais reste fondamentale dans l'optique de développer des dispositifs efficaces et stables dans le temps<sup>89</sup>. La durabilité du système est en effet un enjeu majeur pour leur éventuelle commercialisation.

En outre, la bioélectrocatalyse mise en jeu dans la conception de biopiles enzymatiques consiste en des transferts d'électrons entre la protéine et l'électrode. Ces échanges sont capitaux et dicteront l'efficacité catalytique du dispositif. Il existe deux types de transfert électroniques : le transfert électronique direct (Direct Electron Transfer, DET en anglais) ou le transfert électronique indirect (Mediated Electron Transfer, MET en anglais).

Les conditions d'obtentions de bioélectrodes pour biopiles enzymatiques reposent donc sur l'immobilisation de la biomolécule sur la surface de l'électrode et sur les propriétés de transfert électronique du système.

## **I.2.2 Méthodes d'immobilisation de biomolécules**

### **I.2.2.1 Principe**

L'immobilisation de l'enzyme consiste en l'utilisation de techniques de confinements de biomolécules au sein d'édifices à 2 voire 3 dimensions tout en conservant au maximum les propriétés de l'entité biologique. Pour cela, un certain nombre de facteurs sont à respecter :

- Le confinement de la biomolécule doit permettre l'accès du substrat ou analyte jusqu'au site actif ou de reconnaissance.
- Les propriétés structurales de la protéine doivent être maintenues, sans quoi, les fonctionnalités de réactivité, cinétique et sélectivité peuvent être altérées.

De nombreuses techniques d'immobilisations d'enzyme ont été développées au cours des 20 dernières années<sup>90</sup>. Parmi ceux-ci, l'adsorption, le greffage sur monocouches auto-assemblées (Self-Assembled Monolayer, SAM en anglais), l'encapsulation, la réticulation, les assemblages

supramoléculaires et la formation de liens covalents représentent les méthodes les plus en vues ces dernières années.

#### 1.2.2.2 Adsorption

Une des techniques les plus simples consiste en la simple physisorption de l'enzyme sur la surface, modifiée ou non, du matériau d'électrode (Figure I.8). Son principe repose sur des interactions non spécifiques (hydrophobes ou électrostatiques) entre la biomolécule et l'électrode. Cette méthode présente l'avantage d'être aisée à mettre en place. Elle ne génère en principe pas de gêne stérique laissant le substrat ou analyte diffuser vers l'entité biologique. En revanche, la stabilité des dispositifs réalisés à partir de cette technique peut souffrir du phénomène de désorption de la protéine déposée, rendant ceux-ci inutilisables après un certain temps.

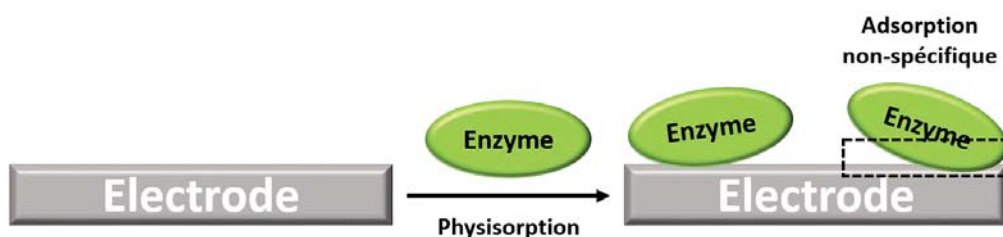


Figure I.8 : schéma représentatif d'une fonctionnalisation de surface par simple physisorption de l'enzyme sur surface d'électrode

#### 1.2.2.3 Réticulation

La réticulation de biomolécules, et plus particulièrement d'enzymes, est une technique relativement ancienne qui a été initiée dans les années 60<sup>91</sup>. Elle permet la formation d'agrégats de protéine par réaction intermoléculaire avec une espèce que l'on appelle fréquemment « cross-linker » (agent de couplage) (Figure I.9 A). Ce dernier est en général composé de deux fonctions souvent identiques à ses extrémités et réactives conduisant au couplage de la protéine par réaction de résidus  $-NH_2$  en surface avec la fonction chimique présente sur le cross-linker. Le plus connu et le plus ancien est très certainement le glutaraldéhyde qui a été abondamment utilisé pour la réticulation d'enzyme<sup>92</sup>. D'autres agents de couplage sont aussi fréquemment utilisés tels que ceux portant des fonctions époxydes ou encore esters activés<sup>93</sup>.

La réticulation donne souvent lieu à la formation d'agrégats difficiles à manipuler en solution et sont donc généralement directement formés sur électrode (Figure I.9 B). La bio-électrode formée est alors beaucoup plus stable dans le temps qu'une simple adsorption. Elle peut également s'appliquer en combinaison avec des polymères, soit en addition ou alors directement sur le polymère<sup>94</sup>.



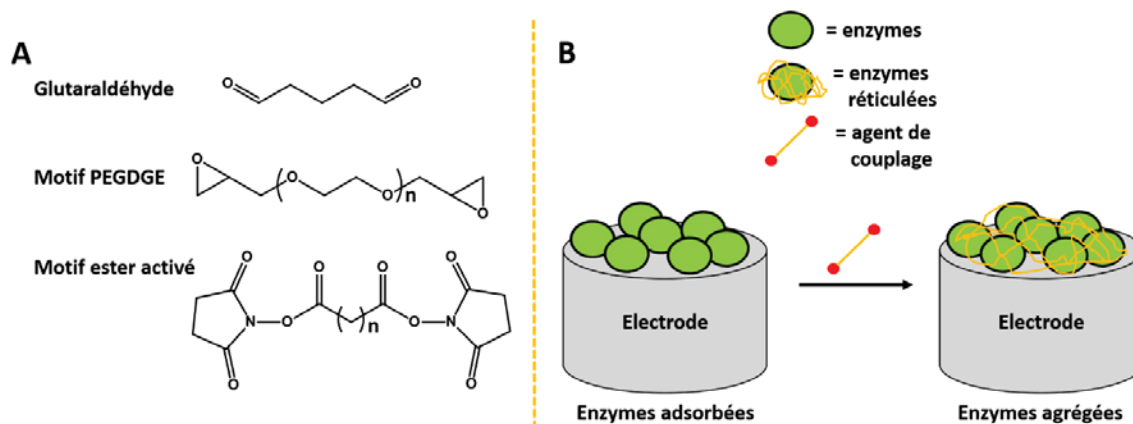


Figure I.9 : A) structures d'agents de couplages couramment utilisés pour la réticulation de protéines B) schéma de réticulation d'enzyme sur la surface d'une électrode

Cette méthode est donc avantageuse par rapport à la simple physisorption et par sa simplicité de mise en œuvre. En revanche elle présente l'inconvénient de pouvoir dénaturer les protéines et donc de diminuer l'activité et la spécificité de certaines biomolécules.

#### 1.2.2.4 L'encapsulation

L'encapsulation consiste en la capture dans un environnement tridimensionnel d'une espèce. La plupart des techniques d'encapsulation se basent sur l'utilisation de polymères. L'immobilisation de l'enzyme au sein d'une matrice polymérique n'est pas une méthode récente et il existe donc un grand nombre d'applications basées sur cette technique. Parmi celles-ci, il est possible de citer par exemple l'utilisation de bio-polymères comme le chitosan ou encore la chitine<sup>95</sup> mais aussi des polymères de synthèse, comme le nafion<sup>96</sup>, qui font partie des plus étudiés (Figure I.10 A). En outre, les polymères électrogénérés constituent une catégorie bien à part. Ils présentent le grand avantage de pouvoir être formés par oxydation (chimique ou électrochimique) d'un monomère de base menant à l'obtention d'un polymère conducteur (Figure I.10 B). Sur surface notamment, ils constituent un outil puissant pour l'encapsulation d'espèces biologiques et leur rétention sur surface. Les plus connus sont donc très souvent utilisés dans cette optique : *poly-pyrrole*, *poly-aniline*, *poly-thiophène*, etc. D'une manière très simple, en mélangeant la biomolécule et le monomère (ou le polymère directement) il est possible par oxydation de former un dépôt à la surface de l'électrode constitué du polymère contenant l'entité biologique encapsulée<sup>97-99</sup>.

Ces films électrogénérés offrent à la biomolécule une couche protectrice prévenant ainsi la dénaturation de l'espèce dans le temps (Figure I.10 C). Il est également possible de moduler à façon les fonctions chimiques arborées par les monomères ou le squelette du polymère afin de faire varier les propriétés finales du polymère.

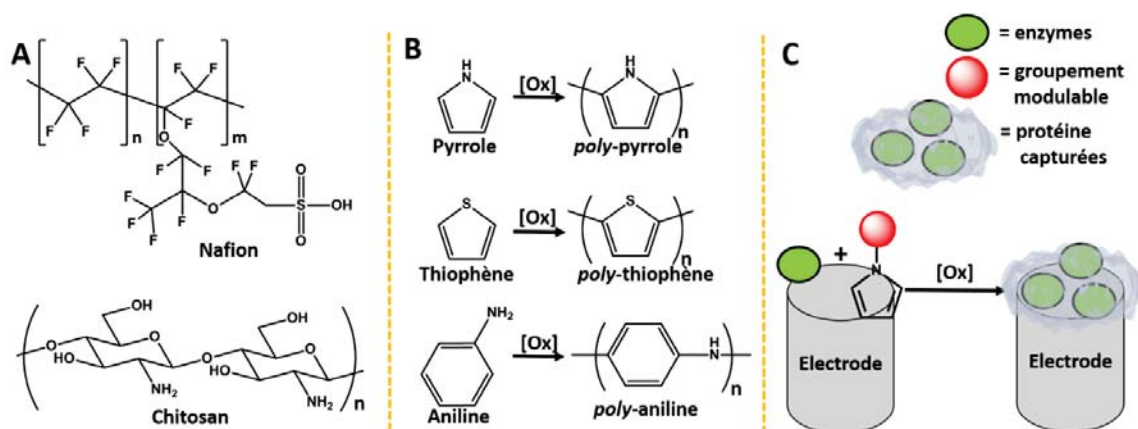


Figure I.10 : A) structure de polymères pour la capture de biomolécule B) Exemple de monomères polymérisables par oxydation chimique ou électrochimique C) Schéma représentant la capture d'une espèce biologique dans un film de poly-pyrrole fonctionnalisable électrogénéré sur électrode

La capture d'une biomolécule dans un polymère présente également l'avantage de former une structure 3D donnant la possibilité d'immobiliser une grande quantité de protéines, beaucoup plus que sur une SAM par exemple qui ne permet que l'obtention d'une monocouche. En revanche, cette technique peut avoir l'inconvénient d'avoir un effet bloquant vis-à-vis du substrat ou de l'analyte pouvant limiter les performances de la bio-électrode.

D'autres techniques d'encapsulation sont basées sur l'incorporation de protéines à d'autres types de matrices inorganiques biocompatibles (couches double hydroxy lamellaires, nanoparticules de carbonate de calcium, etc).

#### I.2.2.5 Assemblages supramoléculaires

Une autre technique élégante pour réaliser l'immobilisation de biomolécules est de tirer avantage des interactions affines et hôte-invité entre une molécule biologique modifiée ou non et une autre molécule de même type ou synthétique. Il s'agit en fait de reproduire ce qui existe déjà dans la nature avec par exemple l'ADN et l'hybridation du double brin ou encore la reconnaissance de certains types de structures saccharidiques par des lectines. Ces modifications peuvent être effectuées sur la protéine mais également à la surface du matériau. Il existe de nombreuses méthodes pour fonctionnaliser des surfaces. Ces modifications peuvent inclure l'utilisation de polymères, de composés aryl diazoniums ou encore de monocouches auto-assemblées (self-assembled monolayer, SAM en anglais)<sup>99,100</sup>. Ces modifications permettent l'incorporation de groupements chimiques permettant de nombreux types d'interactions.

Dans le but de mimer ces interactions affines, il existe à ce jour toute une panoplie de stratégies. Une des plus largement employée consiste en l'utilisation de cyclodextrines (Figure I.11 B)<sup>101</sup>. Elles permettent une reconnaissance forte avec certain type de substrats s'intégrant à l'intérieur de leur cavité hydrophobe. De nombreuses publications décrivent notamment l'interaction entre

des dérivés ferrocène<sup>102</sup> et adamantane<sup>103</sup> avec les cyclodextrines. Le dernier complexe possède une constante d'affinité de l'ordre de  $10^5$ . Une autre stratégie très largement utilisée consiste en l'interaction de dérivé biotine et de (strept)avidine (interaction  $10^{15}$ ) (Figure I.11 A)<sup>104</sup>. Une troisième et importante méthode consiste en la formation d'un complexe de coordination autour de cation cuivre ou nickel avec un résidu nitrilotricétique (NTA) (Figure I.11 C). Ce complexe formé en condition douce permet ensuite la coordination de résidu histidine ou biotine intégrés à l'entité biologique<sup>105</sup>.

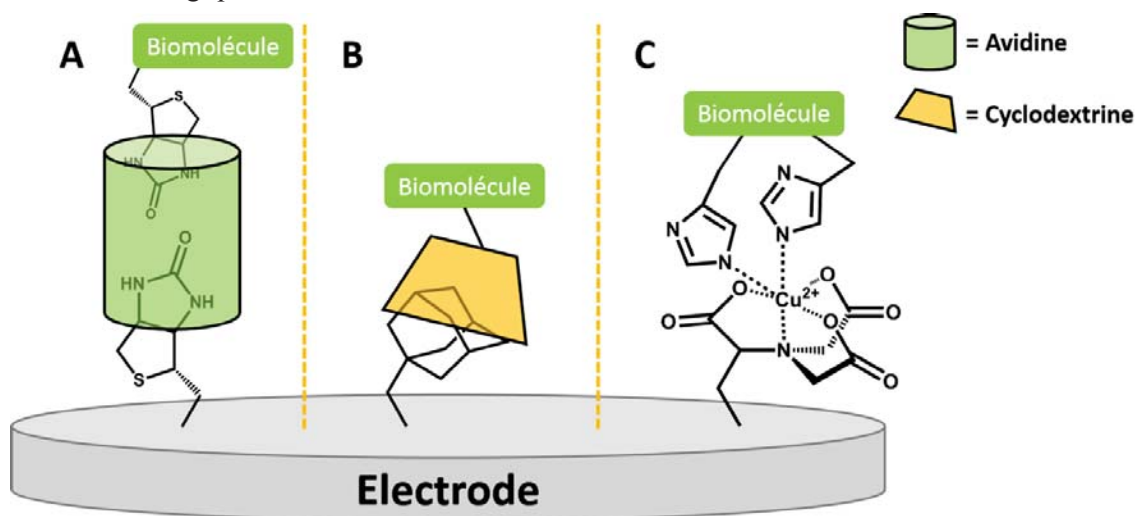


Figure I.11 : schémas représentatifs de différentes méthodes d'immobilisation par interaction supramoléculaires  
A) Dépôt couche par couche biotine/avidine/biomolécule taggée biotine B) interaction adamantane/biomolécule taggée cyclodextrine C) Complexe NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /biomolécule taggée histidine

Ces techniques sont parmi les plus développées mais il en existe beaucoup d'autres se basant par exemple sur les interactions électrostatiques ou encore hydrophobes<sup>106</sup>. Ces interactions présentent toutes l'avantage d'être spécifiques et de s'effectuer dans des conditions douces, n'altérant donc pas les propriétés de la protéine. Cependant certaines d'entre elles nécessitent la modification chimique des biomolécules afin d'incorporer des groupements nécessaires à la reconnaissance comme le tag-histidine pour l'affinité métal ligand ou encore des cyclodextrines pour la formation du complexe adamantane/cyclodextrine.

Pour s'affranchir de ces étapes synthétiques, des études décrivent aussi l'utilisation de protéines de reconnaissance (lectines) pour l'immobilisation d'autres protéines portant des motifs saccharidiques spécifiques.

#### I.2.2.6 Immobilisation par formation d'un lien covalent

La formation d'une liaison covalente entre l'entité biologique et la surface de l'électrode, présentant au préalable une fonction réactive, englobe une grande quantité de réactions différentes. Elle permet l'immobilisation efficace et théoriquement irréversible de la biomolécule.

Un grand nombre de travaux décrivent la simple utilisation de la réactivité de certains acides aminés présents sur les entités biologiques étudiées<sup>107</sup>. Les méthodes de ligation les plus largement utilisées font en général intervenir la réactivité des résidus lysine (-NH<sub>2</sub>) sur des fonctions ester activés ou encore aldéhyde, donnant respectivement lieux à la formation d'un lien amide ou encore amine (Figure I.12 A). La réactivité entre les fonctions thiols (-SH) des résidus cystéine et les groupements maléimide sur surface est elle aussi abondamment décrite (Figure I.12 B). De plus, la plupart des fonctions nucléophiles présentes sur les acides aminés ont la capacité de réagir avec une fonction époxy (Figure I.12 C).

Pour toutes les immobilisations précédentes, il n'est pas nécessaire de modifier la biomolécule. Ce dernier détail a son importance dans la conception de bio-électrode et peut être à double tranchant. En effet, la non modification facilite l'élaboration du dispositif mais ne permet pas de contrôler à quel endroit l'espèce sera greffée ce qui peut se traduire par une mauvaise orientation de la biomolécule limitant les performances de la bio-électrode.

Dans l'idée de contourner ce problème, la modification de l'enzyme en amont peut avoir l'intérêt d'inclure des groupements chimiques spécifiques de certains types de réaction permettant alors un meilleur contrôle sur les conditions de greffage de la biomolécule. Les ligations chimiosélectives les plus utilisées pour greffer des entités biologiques sur surface sont, entre autre : la cyclo addition 1,3-dipolaire de Huisgen (Figure I.12 D), la ligation de Staudinger ainsi que la cyclo addition de Diels-Alder (Figure I.12 E)<sup>107-109</sup>.

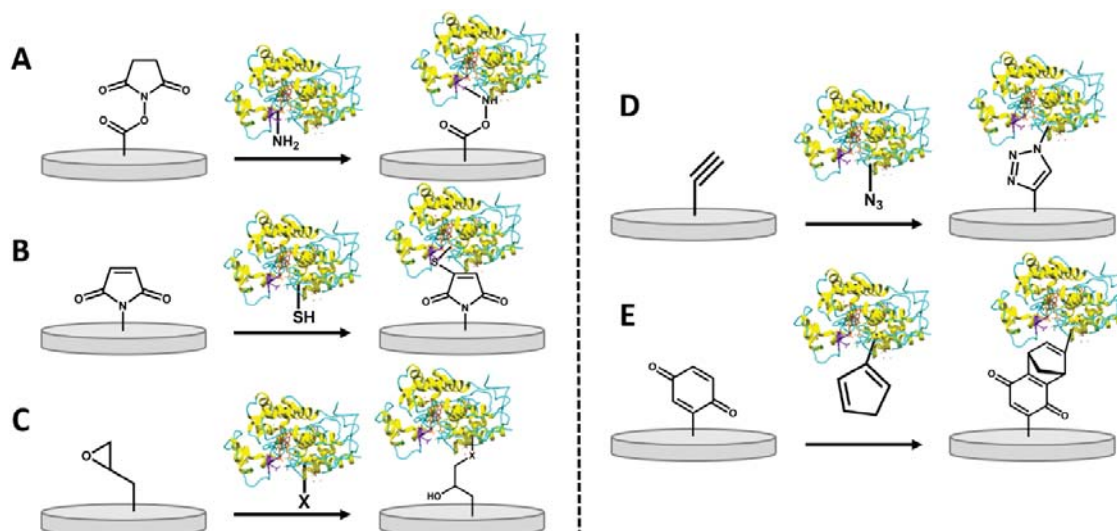


Figure I.12 : Figure: Synthèse simplifiée d'immobilisation covalente sur surface d'électrode A) formation d'un lien amide à partir de la réaction d'un ester activé N-Hydroxysuccinimide (NHS) et d'un groupement amine de la biomolécule B) Réaction d'un résidu cystéine sur un groupement maléimide C) réaction d'un résidu nucléophile sur l'entité biologique avec un groupement époxy sur surface D) réaction de cycloaddition Huisgen catalysée au cuivre entre un alcyne immobilisé et une biomolécule modifiée avec un groupement azido E) réaction de Diels-Alder entre une surface portant un accepteur et une biomolécule portant un donneur

Par rapport aux couplages faisant intervenir des résidus peptidiques non modifiés, ces méthodes, malgré la tâche supplémentaire que représente la modification de l'espèce

biologique, sont particulièrement intéressantes dans l'optique du contrôle de l'orientation du matériel biologique vis-à-vis de la surface de l'électrode.

### I.2.3 Transfert électronique protéine-électrode

#### I.2.3.1 Transfert électronique direct/indirect

Les enzymes rédox consistent en une structure protéique (apoenzyme) incorporant un cofacteur rédox actif capable de transférer les électrons du substrat au cosubstrat. Dans le cas où la protéine rédox est capable d'échanger ces électrons avec l'électrode, remplaçant alors le substrat ou cosubstrat, on parle de processus de transfert électronique direct (DET) (Figure I.13 A).

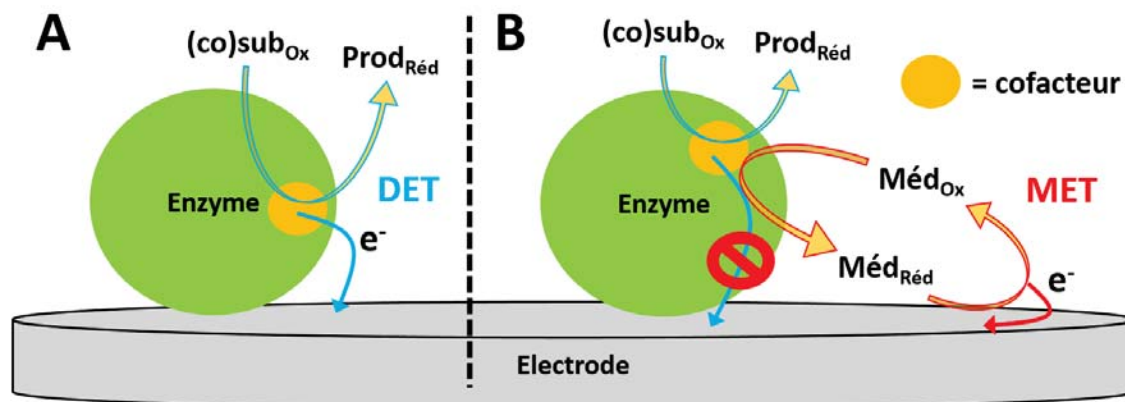


Figure I.13 : Schéma représentatif d'une bioélectrode enzymatique à base de A) transfert électronique direct entre la protéine et l'électrode B) transfert électronique indirect en présence de médiateur rédox

Bien que ce phénomène ait été décrit depuis maintenant plus de 30 ans<sup>62,110,111</sup> et qu'il ait été observé pour de nombreuses protéines, il n'est pas toujours possible d'observer ce DET<sup>34,36</sup>. En effet, selon les protéines rédox étudiées et en fonction du matériau d'électrode, l'échange électronique direct n'est pas toujours favorisé. Dans ce cas, pour pouvoir observer le phénomène bioélectrocatalytique, il est nécessaire d'ajouter une molécule rédox (souvent à faible poids moléculaire) qui aura le rôle de transporteur électronique. On parle alors de transfert électronique médiaté (MET) et l'espèce utilisée comme « navette » est communément appelée médiateur rédox (Figure I.13 B).

Le mode de transfert électronique (DET ou MET) est bien souvent fonction de la biomolécule utilisée et du matériau d'électrode. La taille de la protéine et le degré d'enfouissement au sein de l'enveloppe peptidique dans laquelle se trouve le cofacteur rédox sont des paramètres importants dans la détermination du type de transfert électronique qu'il est possible d'obtenir. En effet, le groupe de Gorton entre autre, a pu démontrer la possibilité de connecter efficacement sur électrode un grand nombre de protéine rédox contenant des cofacteurs de type inorganiques (hèmes, centres cuivres, cluster fer-soufre). Ces enzymes sont souvent de petite

taille et le site actif relativement accessible<sup>112,113</sup>. En fonction de leur orientation sur l'électrode il est donc possible d'effectuer un transfert direct. A l'inverse, peu de DET ont pu être observés pour des protéines contenant des cofacteurs de type organique, qui sont souvent plus en profondeur dans la protéine, rendant plus difficile l'échange électronique enzyme/électrode<sup>34</sup>. De même, la structure du matériau d'électrode utilisé a une influence. Le cas des nanotubes de carbone sera particulièrement décrit dans la partie 3.

Les deux méthodes de transfert d'électrons présentent des avantages et des inconvénients. Dans le cas d'une bioélectrode destinée à l'élaboration d'une biopile, un DET efficace permet d'obtenir une bioélectrocatalyse au potentiel rédox de l'enzyme. Ce potentiel est bien souvent très proche des valeurs thermodynamiques d'oxydation ou de réduction des substrats.

Cependant, lors de la conception de la bioélectrode, il est très difficile de connecter directement toutes les protéines qui ont été immobilisées sur l'électrode. En conséquence, une certaine quantité des enzymes utilisées n'est pas impliquée dans le cycle d'électrocatalyse. A l'inverse, grâce à l'utilisation d'un médiateur rédox, il est possible d'optimiser le nombre de protéines transférant les électrons. Il est également possible, dans certains cas, d'observer un mélange entre MET et DET<sup>114</sup>.

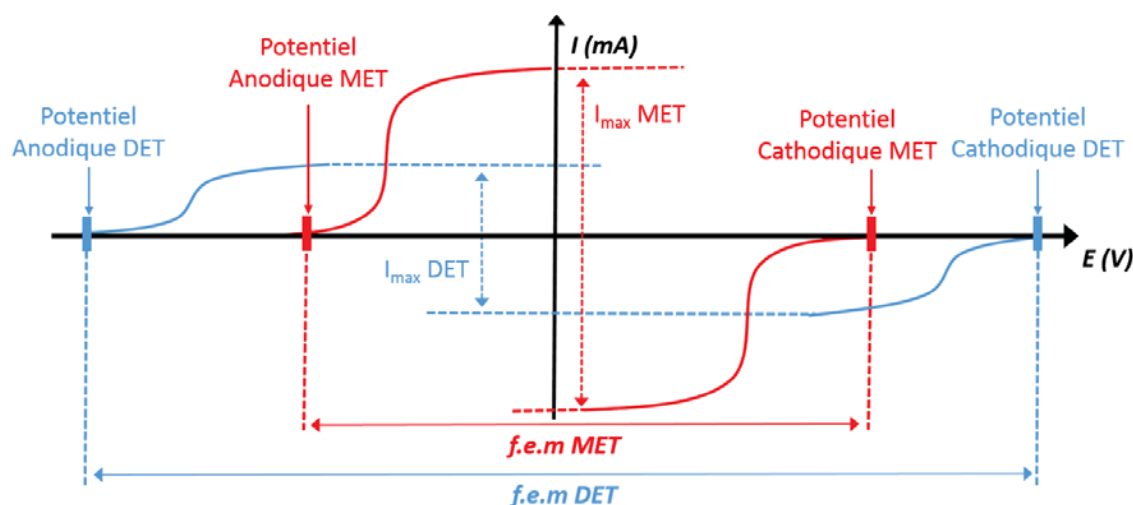


Figure I.14 : Représentation graphique,  $I = f(E)$ , de l'impact sur le potentiel et l'intensité du courant dans le cas d'un transfert électronique direct (à l'anode et la cathode) ou d'un transfert électronique indirect (à l'anode et la cathode)

Une biopile enzymatique consistant en un DET aux deux électrodes garantira un potentiel de pile plus important (Figure I.14)<sup>115</sup>. Inversement, dans le cas de l'utilisation du MET aux deux bioélectrodes, le médiateur permettra d'optimiser les courants catalytiques obtenus en connectant un maximum de protéines, en revanche la f.e.m sera diminuée car limitée aux bornes des potentiels rédox des transporteurs électronique utilisés à la bioanode et à la biocathode. Ceci souligne également l'importance dans le choix du potentiel rédox du médiateur.

Pour les biopiles, l'idéal serait donc de pouvoir connecter directement l'intégralité des enzymes utilisées à l'anode, comme à la cathode, afin d'optimiser à la fois les densités de courant et la différence de potentiel de la pile, donnant alors accès à des puissances supérieures. Mais,



dépendant du système enzymatique utilisé, la possibilité d'un DET de part et d'autre de la biopile n'est pas toujours possible. En effet, si certaines enzymes sont facilement connectées sur électrode, d'autres en revanche nécessitent la présence d'un médiateur pour transférer les électrons.

Il existe une très grande variété de médiateurs rédox couramment utilisés dans l'élaboration de biopiles. Parmi les plus connus, on retrouve des complexes métalliques (complexes d'osmium, ferrocène), des dérivés de types quinones, azines ou encore viologène. La médiation peut s'opérer avec les deux espèces (enzyme et médiateur) en solution, mais l'évolution de la conception des bioélectrodes pour biopile se tourne désormais vers l'immobilisation des deux entités afin de ne plus avoir à compartimenter les deux éléments de la pile. Pour être un bon candidat en tant que médiateur rédox, la sonde rédox doit donc répondre à plusieurs critères<sup>116</sup> :

- Le potentiel de ce dernier doit favoriser thermodynamiquement la réaction de biocatalyse. C'est-à-dire que son potentiel doit être supérieur à celui de l'enzyme à l'anode, inférieur à celui de la protéine à la cathode. De même, si le potentiel est trop proche de celui de la biomolécule rédox, la faible différence de potentiel peut alors diminuer l'efficacité de l'échange électronique.
- La parfaite réversibilité de son système rédox
- Le transfert électronique enzyme/médiateur doit être efficace pour permettre une bonne électrocatalyse
- La structure chimique de la sonde rédox doit respecter une certaine taille. En effet la protéine étant stériquement encombrée, un médiateur trop volumineux ne pourra pas avoir « accès » au site actif et donc collecter ou donner les électrons. Enfin, dans le cas d'un médiateur immobilisé, la taille et la nature de l'espaceur entre la surface et la sonde doivent être contrôlées. Ce dernier doit être flexible et suffisamment grand pour pouvoir faciliter la « diffusion » de la sonde active greffée et doit être solvato pour pouvoir transférer les électrons dans le milieu<sup>117</sup>.

Dans le cadre de l'élaboration de biopile glucose-O<sub>2</sub>, il existe de nombreux exemples de DET ou MET pour une large variété d'enzymes à l'anode, pour l'oxydation du glucose, comme à la biocathode pour la réduction du dioxygène.

#### I.2.3.2 DET et MET à la biocathode pour la réduction de O<sub>2</sub>

Les systèmes enzymatiques pour la réduction du dioxygène utilisés pour la conception de biopiles glucose-O<sub>2</sub> ont été présentés respectivement dans la partie I.1.3.2.2. A la cathode, les MCOs (Laccase et Bilirubine Oxydase) ont été très largement employées en DET pour effectuer

la réduction de  $O_2^{118}$ . Mais, toujours dans l'idée de connecter un maximum de protéines, le MET pour ces MCOs a également été abondamment étudié.

#### 1.2.3.2.1 DET et MCOs

- La connexion de laccase (Lac) par DET

La Lac est l'une des plus anciennes protéines ayant présentée un DET pour la réduction de  $O_2^{62}$ . Depuis les travaux de Tasarevich et al., de nombreuses études ont fait état de la possibilité de réduire  $O_2$  à haut potentiel (0,6 V Vs SCE) grâce au transfert électronique de la Lac adsorbée sur la surface de l'électrode. En effet la Lac est une petite protéine (60 KDa) à cuivre dont le site T1 à Cu mononucléaire, par où sont collectés les électrons pour réduire  $O_2$  au site T2/T3, est situé en périphérie de l'enveloppe protéique<sup>63,119</sup>. Ces caractéristiques rendent cette enzyme relativement facile à connecter par orientation « statistique » sur de nombreux matériaux d'électrode (Figure I.15 A)<sup>120-122</sup>.

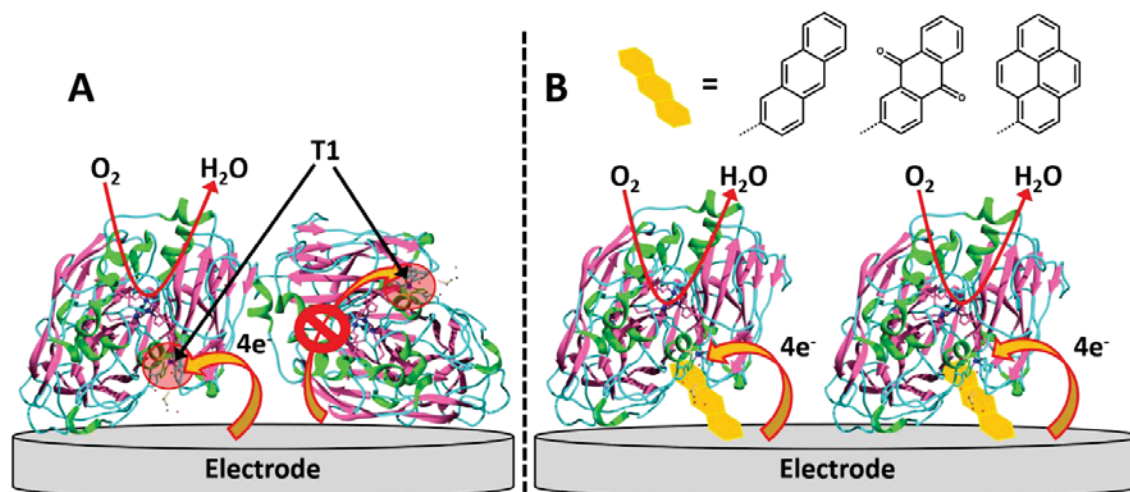


Figure I.15 : schéma représentatif de A) dépôt avec orientation « statistique » de la laccase B) orientation contrôlée de la Lac par reconnaissance supramoléculaire de dérivés aromatiques avec la poche hydrophobe proche du site T1

Le désavantage de cette orientation « statistique » se caractérise par une dispersion des constantes de transfert d'électrons interfaciales particulièrement influencées par la distance entre le T1 et l'électrode<sup>123</sup>.

En s'appuyant sur les travaux de Bertrand et al.<sup>124</sup>, décrivant l'existence d'une poche hydrophobe à proximité du site T1 de la Lac, l'équipe de Armstrong a démontré la possibilité d'orienter le site T1 sur la surface de l'électrode<sup>125</sup>. En modifiant la surface de leur électrode à l'aide d'un groupement anthracène, un composé aromatique hydrophobe, ils se sont aperçu que ce dérivé mimant le substrat de la protéine permettait de connecter très efficacement la métalloenzyme (Figure I.15 B). Les courants obtenus par cette méthode d'orientation étaient de l'ordre de  $0,65 \text{ mA.cm}^{-2}$ , quatre fois plus important qu'une immobilisation « statistique », avec



une rétention de ces courants catalytiques sur plusieurs dizaines de jours. Schuhmann et Bartlett ont appuyé ce résultat en 2012, ils ont réussi à montrer que, grâce la modification de la surface avec un dérivé anthraquinone, il était possible de connecter la totalité des enzymes immobilisées sur la surface et de n'être alors limité que par la diffusion de  $O_2$ <sup>126</sup>. Depuis, un bon nombre de travaux ont décrit la modification de surface avec plusieurs dérivés aromatiques hydrophobes (pyrène, naphthalène) permettant l'obtention d'un DET accru<sup>127,128</sup>.

- La connexion de la Bilirubine Oxydase (BOD) par DET

La BOD présente de nombreuses similarités structurales avec la Lac, notamment la présence d'un site T1 et d'un site T2/T3<sup>66</sup>. N'étant pas inhibée par les ions  $Cl^-$  et restant active à pH neutre, elle est abondamment étudiée à l'heure actuelle comme alternative à l'utilisation de la Lac pour l'élaboration de biocathodes opérationnelles en milieu physiologique<sup>67</sup>. Depuis une dizaine d'années, un certain nombre de travaux ont pu décrire la connexion directe de cette métalloprotéine sur électrode pour la réduction du dioxygène<sup>129-132</sup>.

Similairement à la Lac, la connexion électrique de la BOD s'opère par le transfert des électrons de l'électrode au site T1 Cu mononucléaire de la protéine. Pour maximiser les chances de DET il est donc préférable de minimiser la distance entre T1 et l'électrode. Ramirez et al ont pu montrer en 2008 la possibilité de diriger la connexion de la BOD au niveau du site T1 ou du site T2 en fonction du matériau d'électrode utilisé<sup>133</sup>. Ils ont alors pu observer indépendamment les potentiels des deux sites catalytiques. Le T1 serait donc autour de 0,45 V Vs SHE et le T2/T3 autour de 0,39 Vs SHE. En 2011, le groupe de Blanford a pu montrer la possibilité d'accroître la quantité de BOD connectée directement sur électrode en modifiant la surface de celle-ci par de la bilirubine (substrat naturel de la BOD)<sup>66</sup>. Par cette méthode, le courant catalytique de réduction de  $O_2$  a pu être multiplié par 2. Plus récemment encore, Ulyanova et al. ont démontré des propriétés similaire par modification de l'électrode avec de la syringaldazine<sup>134</sup>. Là encore, les propriétés catalytiques de la cathode BOD ont pu être augmentées par un facteur 2.

#### 1.2.3.2.2 MET et MCOs

- La connexion de Lac par MET

Lorsque le transfert direct de la Lac n'est pas optimal et que les matériaux d'électrodes ne sont pas modifiés par des groupements favorisant le DET, le MET devient indispensable à l'obtention de fort courants catalytique de réduction du dioxygène. Depuis les débuts de l'utilisation de la Lac pour la réduction de  $O_2$ , de nombreuses sondes rédox ont été décrites pour la connexion (« wiring » en anglais) de cette enzyme. Un des plus connus est l'ABTS (pour

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). Ses propriétés de médiation de la Lac pour la réduction de  $O_2$  ont été amplement décrites, en solution ou immobilisé sur surface d'électrode (Figure I.16 A)<sup>135-137</sup>.

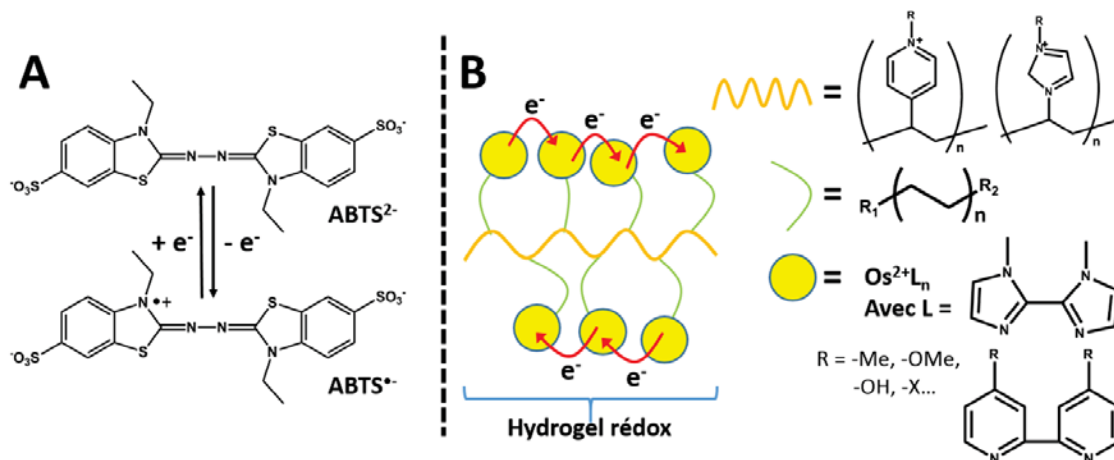


Figure I.16 : A) système rédox de l'ABTS, médiateur de la Lac et BOD B) schéma représentatif de la structure et composition des hydrogels à base d'osmium pour la connexion enzymatique

Une autre grande classe de médiateur de la Lac est représentée par la série des polymères rédox à bases d'osmium. Ces hydrogels se présentent sous la forme de polymères, fonctionnalisés par des complexes d'osmium en majorité (Figure I.16 B)<sup>138</sup>. Un des grands intérêts de cette architecture est de pouvoir faire varier chaque composante du polymère rédox. Par exemple, la sphère de coordination du complexe peut être composée de ligands bipyridine, terpyridine, bisimidazole qui peuvent eux même être fonctionnalisés par différentes fonctions chimiques faisant varier le potentiel rédox du couple  $Os^{III}/Os^{II}$ <sup>139</sup>. De même, le squelette de la chaîne polymérique peut également être modulé. Il existe de nombreux exemples de polymères à base de poly(vinyle-pyridine) (PVP), poly(vinyle-imidazole) (PVI) ou encore de copolymère poly(vinyle-imidazole)/poly(vinyle-acrylamide) (PVI/PVA). La longueur de l'espaceur entre la chaîne polymérique et la « tête » rédox active peut aussi être contrôlée<sup>117</sup>. Grâce à la possibilité de moduler tous ces paramètres, l'utilisation de ces polymères rédox est particulièrement attractive pour la connexion d'enzymes rédox. Notamment, la possibilité de faire varier le potentiel rédox du cation tout en le solvant (grâce à l'espaceur) permet de facilement connecter une grande quantité de protéines rédox. Encore aujourd'hui, ces hydrogels sont abondamment utilisés pour le transfert médié de la Lac dans les biocathodes pour la réduction de  $O_2$ <sup>140-142</sup>.

#### - La connexion de BOD par MET

La BOD ayant des caractéristiques structurelles et fonctionnelles très proches de celles de la Lac, les médiateurs utilisables pour une cathode à BOD sont très similaires. En premier lieu, l'ABTS est un médiateur bien connu de la BOD. C'est d'ailleurs en utilisant ce dernier que

Tsujimura et al. ont pour la première fois, en 2001, pu observer la réduction électrocatalytique du dioxygène par la BOD<sup>143</sup>. Malgré son potentiel d'électrocatalyse plus bas que la Lac, sa stabilité en conditions physiologiques fait de la BOD une alternative particulièrement étudiée pour la conception de biocathodes pour biopiles glucose-O<sub>2</sub> implantables. De ce fait, elle a pu être abondamment étudiée ces dix dernières années en MET grâce à l'utilisation d'hydrogels d'osmium aux propriétés similaires à ceux utilisés pour la Lac<sup>43,69,144</sup>.

### 1.2.3.3 DET et MET à la bioanode pour l'oxydation du glucose

Les types d'enzymes utilisées couramment dans la conception d'anode pour l'oxydation du glucose dans les biopiles glucose-O<sub>2</sub> ont été décrits dans la partie I.1.3.2.2. La GOx, les GDH et la CDH sont les plus couramment étudiées. On retrouve des exemples de DET pour tous ces systèmes enzymatiques. Cependant, la difficulté de connecter certaines de ces enzymes ont motivés l'élaboration de médiateurs adaptés aux potentiels de ces dernières<sup>116</sup>.

#### 1.2.3.3.1 *DET pour l'oxydation du glucose*

##### - La connexion de GOx par DET

La GOx fait partie des enzymes rédox qui ont été les plus largement étudiées pour leurs applications dans de nombreux domaines liés aux biotechnologies<sup>71</sup>. En particulier, avec le développement des biocapteurs la GOx a reçu une attention toute particulière ces 40 dernières années<sup>70</sup>. A la suite de quoi, elle a logiquement été intégrée à des bioanodes pour l'oxydation du glucose pour les biopiles glucose-O<sub>2</sub>. Dans cette optique, de nombreux groupes ont présenté la possibilité de connecter la GOx en DET sur différents matériaux d'électrode (nanoparticules, nanotubes de carbone)<sup>145-148</sup>. La majorité de ces études présentent la possibilité d'observer le couple rédox FAD/FADH<sub>2</sub> de la GOx à -0,5 V Vs SCE, certaines montrent également la possibilité de réduire O<sub>2</sub> catalytiquement grâce au DET de la GOx. Cependant, le DET de la GOx (native) reste controversé, ceci depuis de nombreuses années<sup>149</sup>, puisque un grand nombre d'études soulignent l'impossibilité de transférer les électrons directement de la GOx réduite (FADH<sub>2</sub>) à l'électrode. Cette hypothèse pourrait être appuyée par le fait que la GOx est une protéine très volumineuse (de 130 à 175 kDa selon l'origine) et abondamment glycosylée (16% du poids moléculaire chez *Aspergillus niger* par exemple). Du fait de cet encombrement stérique, le DET ne serait donc pas favorisé. Goran et al. ont pu en particulier expliquer que la présence d'un pic réversible du couple FAD/FADH<sub>2</sub> après l'immobilisation de GOx sur électrode n'était pas dû à une réponse du cofacteur à l'intérieur de l'enveloppe protéique mais bel et bien à la présence de FAD seules, dissociées de la protéine adsorbé sur l'électrode<sup>150</sup>. Si le DET de l'enzyme native semble particulièrement difficile à obtenir, il est en revanche

possible de modifier structurellement l'enzyme par ingénierie biomoléculaire. De cette manière, Courjean et al. ont montré, en 2009, qu'il était possible d'obtenir un excellent DET entre la GOx et l'électrode pour l'oxydation du glucose en se débarrassant de l'enveloppe glycosylée de la protéine (Figure I.17 A)<sup>151</sup>. Auparavant Kalisz et al. avaient pu démontrer que la déglycosylation de la GOx n'influit pas sur ses propriétés catalytiques<sup>152</sup>. Grâce à cette enzyme déglycosylée, l'oxydation du glucose par la GOx a pu être observé à -0,49 V Vs Ag/AgCl et atteint un maximum de courant catalytique à environ -0,2 V Vs Ag/AgCl de l'ordre de 235  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  en présence de 45 mM de glucose.

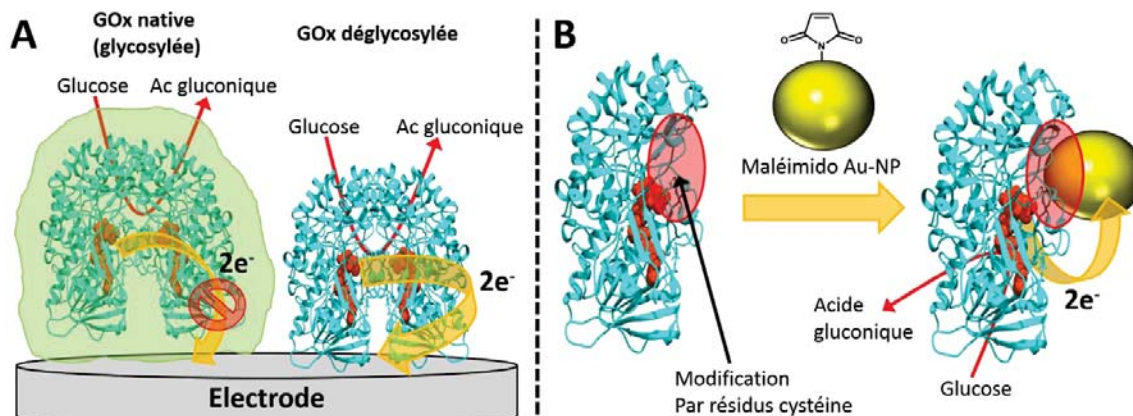


Figure I.17 : A) schéma représentatif du DET obtenu avec une GOx déglycosylée<sup>151</sup> B) Immobilisation d'une GOx mutante sur nanoparticules d'or fonctionnalisées pour l'oxydation du glucose par DET<sup>153</sup>

En 2011, le groupe de Atanassov et Banta a décrit l'expression d'une nouvelle GOx mutante capable de DET sur nanoparticule d'or<sup>153</sup>. Par ingénierie des protéines, ils ont pu créer une protéine modifiée par la présence de résidus cystéines proche du site actif de la GOx. Par formation d'un lien maléimide sur des nanoparticules d'or fonctionnalisées, la GOx a pu être immobilisée et le DET d'oxydation du glucose a alors pu être observé (Figure I.17 B). Cette méthode peut s'apparenter à une méthode d'orientation comme présenté précédemment dans le cas du DET de la Lac ou de la BOD. Il est donc possible d'observer du DET pour l'oxydation du glucose par la GOx dans le cas où l'enzyme a été modifiée de manière appropriée. Sans cela, il apparaît difficile de connecter directement cette enzyme à haut poids moléculaire contenant un cofacteur organique enfoui dans son enveloppe protéique.

#### - La connexion de GDH par DET

La possibilité de connecter les GDH par DET dépend du type de cofacteur. Les GDH  $\text{NAD}^+$ -dépendantes sont théoriquement compliquées à connecter directement sur électrode puisque leur cofacteur est naturellement labile. De plus, la régénération de ce dernier nécessite bien souvent l'utilisation d'un catalyseur d'oxydation de NADH. Le cas de ce type de GDH est traité plus en détail dans le chapitre 2. Au sein de la famille des GDH, les GDH PQQ-dépendantes

sont celles qui ont été le plus étudiées ces dernières années pour obtenir un courant d'oxydation direct du glucose. Cet intérêt peut s'expliquer par l'insensibilité des GDH PQQ-dépendantes à  $O_2$ , les rendant donc plus attractives que la GOx pour l'oxydation du glucose dans les biocapteurs ou biopiles à glucose. Le premier exemple de DET observé en connectant une GDH PQQ-dépendante a été observé en 2004 par Okuda et Sode<sup>154</sup>. Par génie biologique, ils rapportent la fusion entre un domaine cytochrome et la GDH qui a permis l'obtention d'un DET. Peu de temps après deux groupes ont également pu connecter une GDH-PQQ de type membranaire pour obtenir un DET d'oxydation du glucose. Auparavant, en 2005, le groupe de Willner avait décrit la possibilité de reconstituer l'enzyme active sur électrode d'or par simple reconnaissance de l'apoenzyme pour le PQQ immobilisé sur la surface<sup>155</sup>. Plus récemment encore, Flexer et al. ont décrit en 2011 l'élaboration d'une bioanode basée sur le DET de GDH-PQQ permettant l'obtention de fort courant catalytiques<sup>78</sup>. Dans cette étude, le groupe compare le DET de l'oxydation du glucose obtenu avec une protéine sauvage et une mutante décrite une année plus tôt<sup>156</sup>. Là encore, grâce à la modification génétique de la protéine ce groupe a pu obtenir des courants d'oxydation encore plus importants par DET, de l'ordre de  $0,93 \text{ mA.cm}^{-2}$ . En 2012, le groupe de Lisdar a aussi décrit l'élaboration d'une biopile basée sur la connexion directe d'une GDH-PQQ à l'anode<sup>76</sup>.

Les GDH FAD-dépendantes sont aussi étudiées depuis quelques années<sup>157</sup>. Elles sont également insensibles à la présence de dioxygène. Cependant, à l'heure actuelle on trouve peu d'exemples de DET pour ce type de protéine. En 2011, Yehezkeli et al. ont élaborés une biopile glucose- $O_2$  basée sur l'oxydation du glucose par une GDH-FAD à l'anode<sup>158</sup>.

Malgré le peu d'études réalisées sur ce type d'enzyme, leur utilisation pourrait s'avérer une autre alternative prometteuse pour l'élaboration de bioanode à glucose.

#### - La connexion de CDH par DET

La CDH, capable d'oxyder une large gamme de dérivés osidique, a aussi été étudiée ces dernières années concernant l'oxydation du glucose par DET. La présence au sein de la protéine d'un hème ayant le rôle d'accepteur d'électron vis-à-vis de la flavine (site catalytique) facilite grandement les propriétés de connexion directe de l'enzyme à la surface de nombreux matériaux d'électrode. Le groupe de Gorton entre autre, s'est particulièrement intéressé au transfert direct de cette enzyme sur électrode pour diverses applications en biocapteurs et biopiles<sup>159</sup>. Ces dernières années, cette équipe a décrit des protocoles permettant d'améliorer le DET de cette enzyme. Par exemple, en modifiant la surface de l'électrode par des dérivés cationiques, les courants d'oxydation ont pu être augmentés<sup>160</sup>. Une autre méthode élégante, consistant à déglycosyler cette protéine, a permis l'obtention d'un DET accru<sup>161</sup>. Malgré le fait qu'un grand nombre de ces études ne se focalisent pas sur l'oxydation du glucose (lactose ou cellobiose) et que les études sont souvent conduites à pH acide, ce groupe a tout de même

récemment publié des résultats présentant des biopiles opérationnelles en milieu physiologique basées sur l'oxydation du glucose par la CDH<sup>162,163</sup>.

#### *1.2.3.3.2 MET pour l'oxydation du glucose*

Précédemment, de nombreux exemples de DET pour l'oxydation du glucose ont été présentés pour différents types d'enzymes. La plupart de ces résultats sont assez récents et malgré l'avantage que procure le DET en matière de potentiel anodique, il est bien souvent substitué par le MET qui permet de connecter plus efficacement un grand nombre de protéine sur électrode<sup>116</sup>. Les médiateurs rédox utilisés à l'anode pour oxyder le glucose grâce à la GOx, les GDH et la CDH sont nombreux dans la littérature. Quant au cas des GDH NAD<sup>+</sup>-dépendantes, il sera abordé en détail dans le chapitre 3.

##### **- La connexion de GOx par MET**

Etant donnée la difficulté d'obtenir un DET avec la GOx sans modifier la protéine et les nombreuses applications découlant de la bioélectrocatalyse de cette enzyme, de nombreux travaux se sont intéressés à une alternative par transfert indirect. La connexion indirecte de la GOx sur électrode est en effet largement décrite depuis la fin des années 80. Les travaux de Adam Heller, notamment, ont été novateurs dans le développement du transfert médié de la GOx. Ces auteurs ont décrit la possibilité d'utiliser le ferrocène ou encore des hydrogels d'osmium (similaires à ceux présentés pour la connexion des MCOs) pour connecter électriquement la protéine sur électrode<sup>164-166</sup>. Ces espèces sont toujours utilisées dans la conception de biocapteurs ou de biopiles basées sur le MET de la GOx. Notamment, les exemples de biopiles utilisant les hydrogels d'osmium comme médiateurs de la GOx sont particulièrement étudiés, encore aujourd'hui<sup>167-169</sup>. De plus, avec le récent développement des nanomatériaux carbonés, les puissances des piles incorporant ces hydrogels sur des nanostructures sont devenus très proches des valeurs requises pour certaines applications. En 2010, Gao et al. ont décrit une biopile puissante combinant à l'anode la GOx et un hydrogel d'osmium à longue chaîne<sup>170</sup>. Encore plus récemment, le groupe de Nishizawa a combiné ces hydrogels avec des nanotubes de carbone organisés et a obtenu de très forts courants d'oxydation, à l'anode par MET, de la GOx de l'ordre de 15 mA.cm<sup>-2</sup> (Figure I.18 A)<sup>171</sup>.

Si ces hydrogels sont présents dans de nombreuses contributions, d'autres médiateurs peuvent être utilisés pour connecter la GOx. Par exemple, le groupe de Willner a décrit la modification de la surface de l'électrode avec des dérivés viologène ou quinone (PQQ) et, suite à l'immobilisation de l'apo-GOx par reconnaissance du cofacteur FAD, a pu obtenir des courants intéressants par MET (Figure I.18 B)<sup>172,173</sup>.



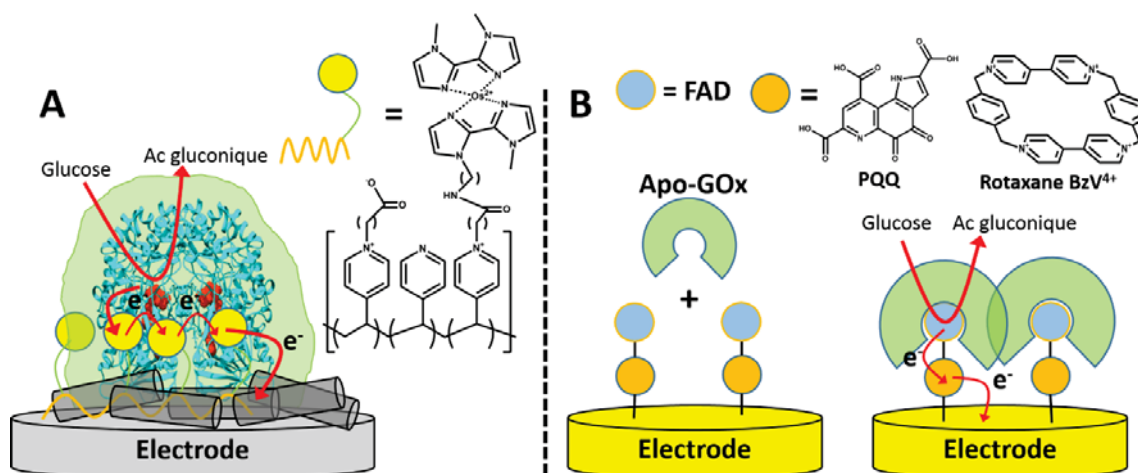


Figure 1.18 : Schéma représentatifs de A) médiation de la GOx par un hydrogel d'osmium sur fibres de CNTs<sup>170</sup> B) médiation de la GOx par reconstitution de l'enzyme sur un espaceur-médiateur de type PQQ ou rotaxane benzylviologène<sup>172,173</sup>

Plus récemment, Giroud et al. ont également rapporté l'utilisation de différentes quinones pour la médiation de la GOx à l'anode de biopiles glucose oxygène pour l'implantation animale<sup>44</sup>.

- La connexion de GDH-PQQ/FAD et CDH par MET

Les GDH PQQ-dépendantes et FAD-dépendantes ou encore les CDH ont aussi été décrites pour l'oxydation du glucose par MET. Les systèmes de médiations de ces enzymes sont proches de ceux déjà décrit pour la GOx<sup>116</sup>. On trouve notamment des exemples de connexion indirecte de la GDH-PQQ avec des dérivés ferrocène et des hydrogels d'osmium<sup>174,175</sup>. On trouve peu d'exemples de FAD-dépendantes en DET mais il existe des exemples de transfert médié par l'utilisation là encore de polymères rédox à bases d'osmium<sup>80,176</sup>. Les systèmes utilisés pour la médiation de la CDH sont aussi principalement basé sur l'utilisation de ces mêmes hydrogels<sup>83</sup>.

## 1.3 Intégration des nanotubes de carbone dans les biopiles glucose-O<sub>2</sub>

### 1.3.1 Structures, propriétés et utilisations des nanotubes de carbone

#### 1.3.1.1 Structures et propriétés

Les nanomatériaux carbonés sont depuis plusieurs décennies en pleine expansion et leurs domaines d'applications sont variés. C'est particulièrement vrai dans les domaines de l'électrochimie analytique et industrielle. Ces matériaux à base de carbone présentent de

nombreux avantages en matière de coût, de fenêtre de potentiel et sont particulièrement prescrits pour l'électrochimie de molécules organiques et biomolécules, vis-à-vis desquelles ils ont de bien meilleures propriétés électrochimiques que les métaux nobles<sup>177</sup>.

Parmi cette famille de nanomatériaux carbonés, les nanotubes de carbones (Carbon Nanotubes, CNTs en anglais) sont de plus en plus utilisés dans de nombreux et divers domaines, des applications médicales à l'électrocatalyse par exemple. Les CNTs ont été décrit pour la première fois en 1991 par Iijima qui démontra la possibilité de former, grâce à l'utilisation d'un arc électrique utilisé pour la fabrication des fullerènes, des tubes de carbone « needle-like »<sup>178</sup>. Il s'agit là, de la première caractérisation de CNTs, bien qu'une étude de 2006 ait prouvé leur présence sur la lame de sabre forgé dans de l'acier de Damas, il y a plus de 3 siècles<sup>179</sup>. Leur appellation initiale de « microtubes graphitiques hélicoïdaux » évolua rapidement en « nanotubes de carbone multi parois » (Multi Wall Carbon NanoTubes, MWCNTs en anglais) décrivant l'inclusion de plusieurs feuillets de graphène enroulés les uns dans les autres. La synthèse de « nanotubes de carbone mono paroi » (Single Wall CNTs, SWCNTs en anglais) a été décrite deux années plus tard en 1993<sup>180</sup>.

Les propriétés de ces SWCNTs peuvent varier en fonction de différents facteurs comme leur chiralité, leur pureté et la quantité de défauts qu'ils contiennent<sup>181</sup>. En effet, en fonction de l'orientation de l'axe du tube par rapport au réseau carboné aromatique, différents types de CNTs peuvent être obtenus et sont décrits par les indices de leur vecteur chirale  $n$  et  $m$  (Figure I.19). Les CNTs de type « armchair » ( $n = m$ ) présentent la plupart du temps une conductivité de type métallique alors que les CNTs de type « zigzag » ( $m = 0$ ) ou chiraux ( $m \neq n$ ) sont plutôt semiconducteurs.

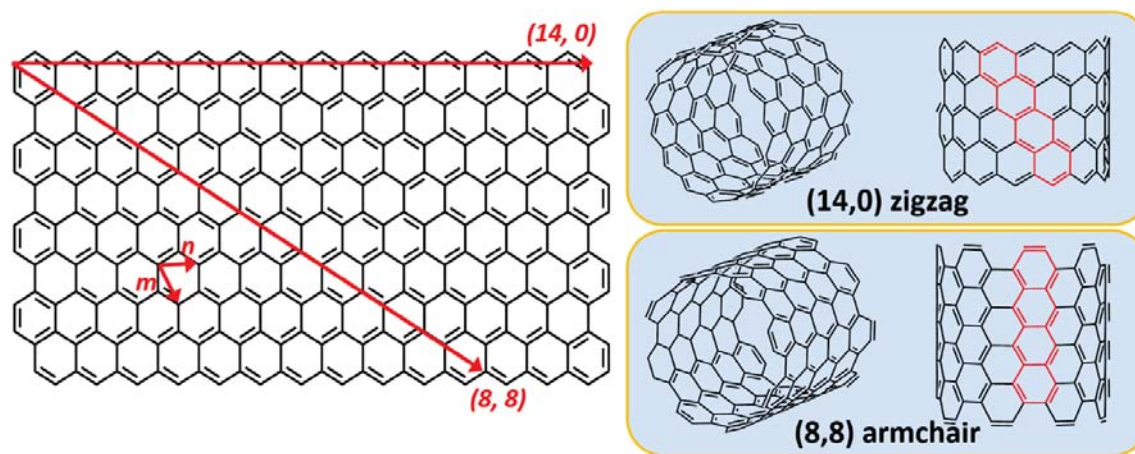


Figure I.19 : schéma représentatif du type d'orientation des CNTs de type « armchair » ou « zigzag » par rapport au plan d'un feuillet de graphène

Outre la différence de chiralité entre les tubes, la conductivité de ces CNTs peut également être affectée par les défauts contenus dans la paroi des CNTs. La structure normalement composée de carbone  $sp^2$  peut présenter des carbones  $sp^3$  portant des fonctions oxydées de type alcool, carbonyle ou acide carboxylique.



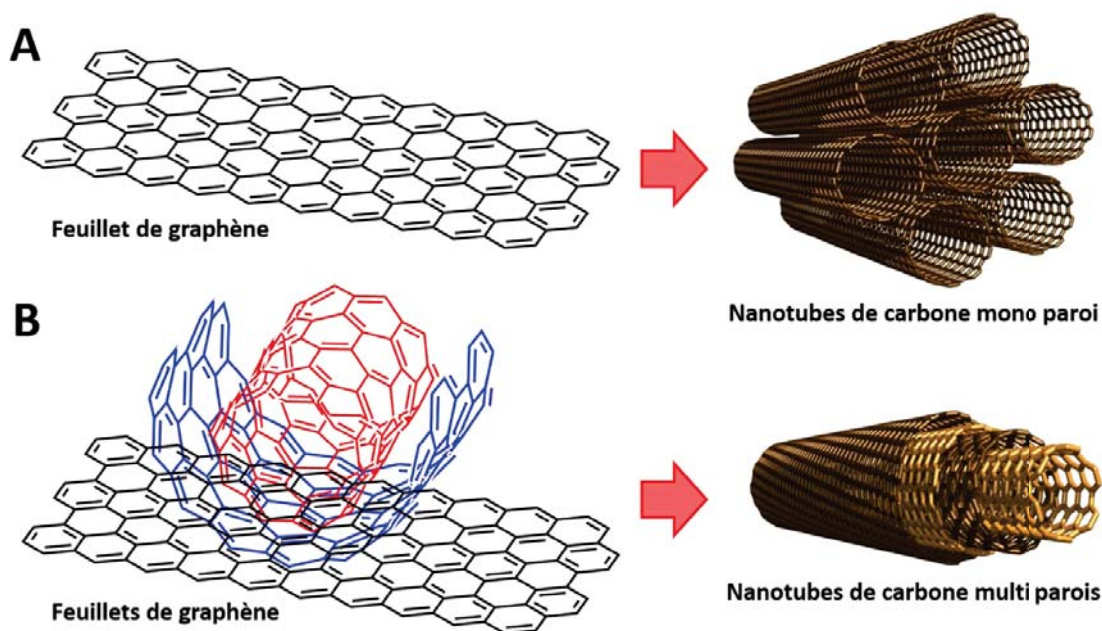


Figure 1.20 : schéma représentatif A) du repliement d'un feuillet de graphène donnant accès à la structure d'un CNT mono paroi B) repliement de plusieurs feuillets de graphène donnant accès à la structure d'un nanotube de carbone multi parois

Si certains SWCNTs peuvent s'avérer être des semi-conducteurs, les MWCNTs, composés de plusieurs SWCNTs sont en général classés comme conducteurs métalliques. En effet, l'existence de plusieurs parois contourne les contraintes de conduction électronique engendrées par la chiralité du SWCNT, par son diamètre ainsi que par ses éventuels défauts. Dans le cas de MWCNTs la possibilité de l'électron de pouvoir passer d'un tube à un autre accroît les propriétés de conduction de la nanostructure.

A ce jour, la majorité des CNTs sont préparés en utilisant l'ablation par arc électrique<sup>182</sup>, l'ablation par laser<sup>183</sup> ou par « déposition de vapeur chimique » (Chemical Vapor Deposition, CVD en anglais)<sup>184</sup>. La CVD est, à l'heure actuelle, la technique la plus employée pour la production de CNTs. Elle se base sur la combinaison de catalyseurs métalliques (le plus souvent fer, nickel ou cobalt) et d'un gaz contenant la source de carbone (éthylène, acétylène) à haute température (700 à 900°C). Les CNTs sont formés et croissent alors au niveau des sites catalytiques.

Les CNTs possèdent donc de nombreuses propriétés : conductivité, large surface spécifique, excellente stabilité thermique et mécanique, possibilité de les modifier chimiquement, les rendant particulièrement attractifs dans de nombreux domaines scientifiques<sup>185</sup>. Ils possèdent néanmoins quelques inconvénients. Leur caractère hydrophobe les rend insolubles dans un très grand nombre de solvants, aqueux et organiques, ce qui ne facilite pas leur manipulation<sup>186</sup>. L'utilisation de surfactants ou la modification chimique des CNTs peut dans certains cas améliorer leur solvation<sup>187</sup>. Chaque méthode de synthèse de ces CNTs aboutit à des nanostructures contenant de grandes quantités d'impuretés<sup>185</sup>. Dans le cas des synthèses par ablation par arc électrique ou laser, le produit est obtenu sous forme d'un mélange de CNTs

aux propriétés diverses et d'impureté. La méthode CVD permet un meilleur contrôle de la synthèse mais n'élimine pas les impuretés métalliques provenant des catalyseurs utilisés. Le procédé HiPco (High Pressure CO) permet d'obtenir des lots de pureté variable, de 65 à 95%. Ceci implique la nécessité de purifier le produit après synthèse. La purification des CNTs est bien souvent une combinaison de plusieurs étapes de filtration, oxydation, dissolution et suspension<sup>188</sup>.

#### 1.3.1.2 Les nanotubes de carbone comme matériau d'électrode

Depuis leur découverte, les CNTs ont vu leurs champs d'applications se développer considérablement au cours des deux dernières décennies. Notamment, les CNTs sont désormais abondamment utilisés dans de nombreux domaines liés à l'électrochimie : piles à combustibles, super condensateurs, batteries Lithium ion, électrocatalyse ou capteurs électrochimiques<sup>181</sup>. Dans toutes ces applications, les CNTs sont utilisés comme matériau d'électrode. Leur propriété à conduire les électrons sur de très larges surfaces développées fait d'eux une matrice de choix pour toutes les technologies impliquant des transferts électroniques<sup>189</sup>. Les CNTs donnent la possibilité d'élaborer des architectures d'électrodes particulièrement variées qui peuvent s'avérer avantageuses dans de nombreuses applications, pour la conversion et le stockage d'énergie par exemple. L'utilisation de ces matrices de CNTs, par rapport aux matériaux graphitiques, a d'ores et déjà démontrée la possibilité d'améliorer les performances des batteries Li-ion, super condensateurs électrochimiques et capteurs électrochimiques<sup>181,190-193</sup>. L'application de ces nanostructures à base de CNTs dans les biopiles enzymatiques est détaillée plus précisément dans le chapitre 2.

Une méthode bien particulière d'élaborer des nanostructures de CNTs est la fabrication de films fins composés de CNTs. Ces films sont particulièrement intéressants de par la possibilité de moduler leurs propriétés en fonction du type de CNTs utilisé et de la méthode de conception<sup>194</sup>. Ces nanostructures peuvent être obtenues directement par CVD ; le film croît alors directement sur le substrat choisi (« direct growth » en anglais), ce qui peut donner accès à des nanostructures particulièrement organisées. Le désavantage de cette technique provient de l'éventuelle pollution de l'échantillon par les impuretés métalliques restantes<sup>194</sup>.

Une autre méthode de choix pour élaborer ces films est la déposition sur le substrat d'une phase liquide (« solution based deposition » en anglais), ce qui sous-entend que les CNTs ont pu être dispersés au préalable. La méthode la plus fréquemment employée pour obtenir une bonne dispersion de CNTs, d'autant plus en milieu aqueux, requiert l'utilisation d'un surfactant<sup>195</sup>. Ce surfactant, à caractère amphiphile, va en quelque sorte « séparer » les agrégats de CNTs par interaction d'une partie hydrophobe avec la paroi des CNTs et interaction d'une partie hydrophile avec le solvant aqueux. Une autre technique assez proche consiste à utiliser des polymères qui entreront en interaction avec les CNTs par interactions  $\pi$ - $\pi$  de dérivés

aromatiques portés par le polymère<sup>196</sup>. Ces deux techniques ont l'avantage de ne pas être destructrices vis-à-vis des propriétés des CNTs mais présentent le désavantage de rajouter une étape supplémentaire de lavage si le surfactant ou le polymère ne sont pas désirés sur le film<sup>194</sup>. Lorsqu'une bonne dispersion de CNTs est obtenue, l'étape suivante consiste à déposer ce film sur un substrat. Pour ce faire, il existe de nombreuses méthodes. Les méthodes de « Langmuir-Blodgett » (LB), de couches auto-assemblées (self-assembly, SA en anglais), de « dip coating » (DC), de formation de « bucky papers » ou encore de « drop coating » d'encres à base de CNTs (DCo) sont particulièrement utilisées<sup>194</sup>. Brièvement, les techniques de LB et de DP consistent à immerger le substrat choisi dans la dispersion et à ensuite émerger le substrat hors de la solution, entraînant ainsi la déposition d'une couche de CNTs sur la surface. La formation de couches auto-assemblées se base elle sur l'interaction préférentielle des CNTs avec la surface du substrat, dont la nature doit être adaptée aux types de CNTs utilisés. La filtration de dispersions de CNTs et l'obtention de « bucky papers » consistent tout simplement à filtrer la dispersion. Cette technique présente le grand avantage de produire des films parfaitement régulier, l'épaisseur est contrôlée par le volume de dispersion filtré. Le « drop coating » consiste à déposer et sécher un volume fini d'une dispersion de CNTs (parfois accompagnée de surfactants ou de stabilisants) à la surface du substrat. Ces techniques peuvent également être accompagnées de méthodes de transfert des films d'un substrat à un autre par utilisation d'une membrane soluble<sup>197</sup>, d'une surface adhésive<sup>198</sup> ou encore par impression par microcontact<sup>199</sup>. Ces films offrent de nombreux avantages pour l'élaboration de matériaux d'électrode. De plus, la possibilité d'ajouter des fonctionnalités au dépôt rend cette technologie encore plus attractive dans l'optique d'élaborer des matériaux et des électrodes modifiées. En effet, les CNTs sont une plateforme fonctionnalisable.

#### 1.3.1.3 Modifications et fonctionnalisation des CNTs

Les CNTs peuvent être considérés comme des macromolécules. Ils sont constitués d'une succession de cycles aromatiques et d'une certaine quantité de fonctions réactives telles que des carbonyles ou encore des acides carboxyliques. De ce fait, il est possible de les modifier, de les fonctionnaliser chimiquement ou électrochimiquement en tirant avantage de leur système  $\pi$ -conjugué et des fonctions chimiques qu'ils présentent à leur surface. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses méthodologies ont été mises en place pour permettre d'introduire de nouvelles propriétés à ces CNTs. De par la nature des CNTs, différentes approches ont été employées pour les modifier de manière covalente ou non covalente<sup>200,201</sup>. Il est également possible d'inclure des motifs à l'intérieur des CNTs ou encore de « décorer » les CNTs avec des nanoparticules.

### 1.3.1.3.1 Fonctionnalisations covalentes des CNTs

La modification des CNTs par approche covalente, par rapport à l'approche non covalente, permet d'accéder à des nanostructures « décorées » et très stables sur un carbone hybridé  $sp^3$  sur le CNT. En revanche, l'inconvénient de cette technique est la génération de défauts au sein de la structure poly-aromatiques du tube. Ceci peut avoir pour effet d'altérer les propriétés mécaniques et conductrices des CNTs. Les méthodes de modifications covalentes peuvent être divisées en deux catégories : estérification ou amidation de CNTs oxydés et réactions d'additions (cycloadditions, additions nucléophiles, etc)<sup>202</sup>.

L'oxydation des CNTs est l'une des techniques de modification parmi les plus utilisées. Cette dernière est nécessaire dans l'optique de réaliser par la suite des réactions d'estérification ou d'amidation des CNTs. Elle consiste à placer les CNTs (MW ou SW) en milieu acide et oxydant afin de générer la formation d'espèces oxydées de type carbonyles et acides carboxyliques (Figure I.21). Ces traitements peuvent aussi être effectués en bain à ultrason pour favoriser à la fois la réaction et la dispersions des CNTs. Lorsque ces traitements, en conditions dures, sont effectués pendant de longues durées, ils peuvent endommager considérablement les propriétés électroniques des CNTs par la destruction du système  $\pi$ -conjugué. Le degré d'oxydation des CNTs augmente avec la durée et la dureté du traitement<sup>203</sup>.

Grâce à la présence de ces groupements activables tels que les acides carboxyliques aux extrémités des CNTs, il est possible d'effectuer des réactions d'estérifications ou encore des couplages de type peptidiques (Figure I.21)<sup>204</sup>.

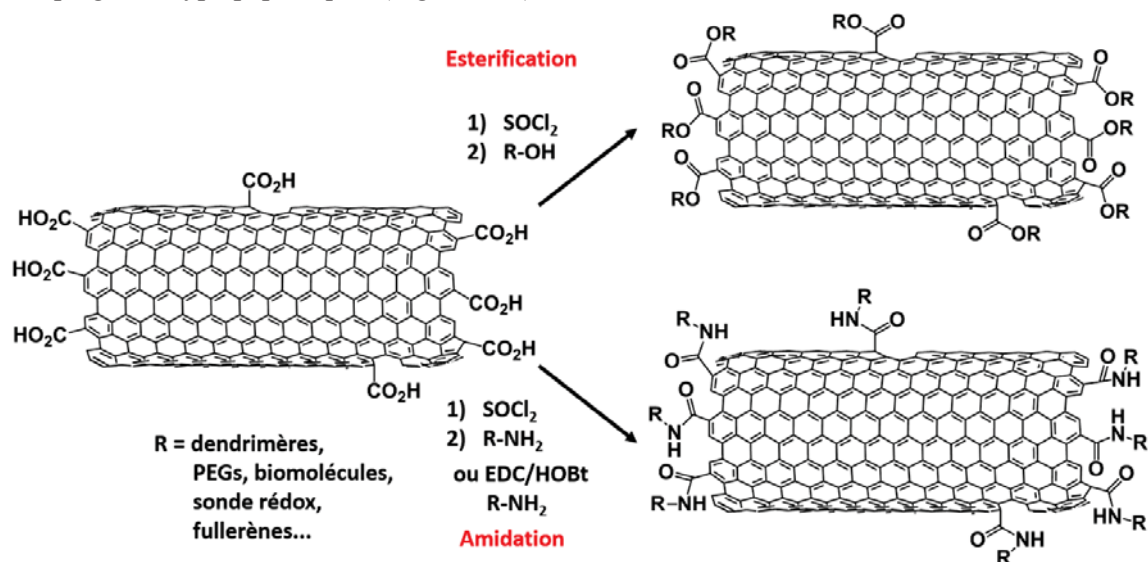


Figure I.21 : Schéma de réaction d'estérification et d'amidation de CNTs oxydés

L'autre grand type de réactions utilisé pour la fonctionnalisation des CNTs englobe un certain nombre de réaction d'additions. Ces réactions sont censées permettre la modification des extrémités des CNTs et également des parois. En réalité, la réactivité des CNTs est bien plus

importante au niveau des extrémités que sur les parties latérales du CNT. Il est avéré que les CNTs ne sont pas des structures idéales, ils contiennent des défauts le long de leur chaîne aromatique. Des études ont pu démontrer que ces réactions d'additions se déroulaient préférentiellement au niveau de ces défauts<sup>205</sup>. Toutes ces modifications peuvent donc être réalisées sur les CNTs non oxydés, mais les rendements de fonctionnalisations seront plus importants sur des tubes préalablement oxydés.

Au sein de toutes les méthodes d'additions décrites pour modifier les CNTs, les réactions de cyclo-additions sont très nombreuses et très largement utilisées pour fonctionnaliser la paroi des CNTs. L'un des premiers exemples est la cyclo-addition [2+1] de dérivés carbène sur le système aromatique de la paroi des CNTs (Figure I.22 A)<sup>206</sup>. Un autre type de cyclo-addition de type [2+1] sur les CNTs par la formation d'intermédiaires nitrène a été intensément étudié par le groupe de Hirsch (Figure I.22 B)<sup>207,208</sup>.

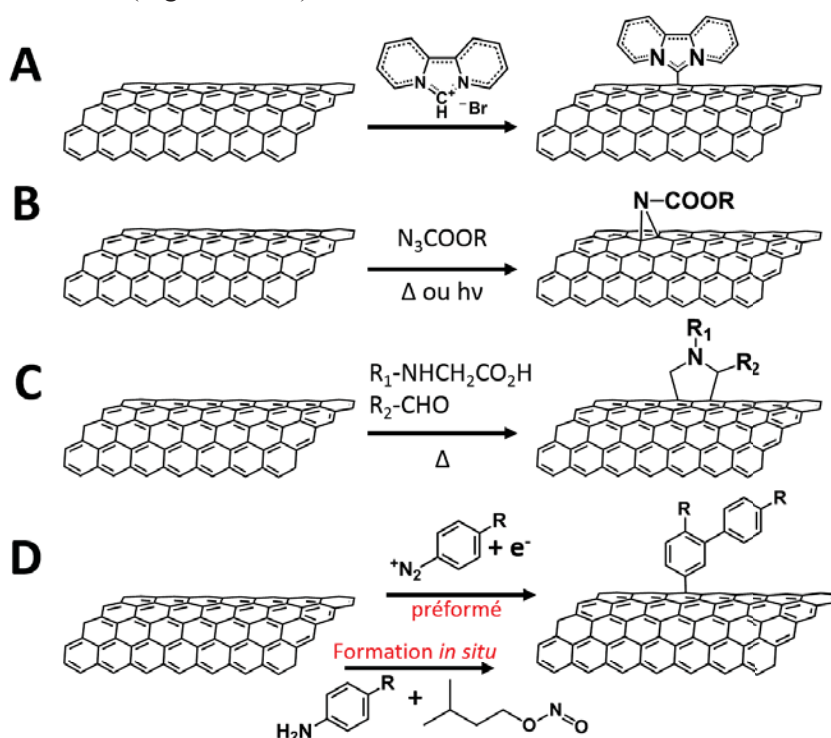


Figure I.22 : Modification des CNTs par différentes réactions d'addition A) addition d'un carbène B) addition d'un dérivé nitrène C) addition d'un ylure de méthine (réaction de Prato) D) modification des CNTs par formation d'un sel de diazonium, préformé ou in situ

De même, les cyclo-additions 1,3-dipolaires ont été particulièrement étudiées pour permettre la modification des parois des CNTs (Figure I.22 C). Plus particulièrement, le groupe de Prato a développé une méthode attractive basée sur la formation d'ylure de méthine<sup>209</sup>.

D'autres méthodes simples réalisables par assistance micro-ondes ont également été décrites comme la cyclo-addition de Diels-Alder par exemple, ou encore la cyclo-propanation [2+1] dite



de « Bingel » et enfin la cyclo-addition 1,3-dipolaire par réaction de dérivés aziridine sur les CNTs<sup>210-212</sup>.

Enfin parmi toutes les méthodes de fonctionnalisation employées, une des plus importantes pour la modification d'électrode est la réaction d'arylation radicalaire des CNTs (Figure I.22 D). Elle a été décrite pour la première fois par Pinson et Savéant en 1992 pour la modification électrochimique de matériaux carbonés par la réduction d'un sel de diazonium aromatique<sup>213,214</sup>. Cette réaction a ensuite été décrite sur CNTs par le groupe de J. Tour en 2001<sup>215</sup>.

#### *1.3.1.3.2 Fonctionnalisations non covalentes des CNTs*

Les méthodes de fonctionnalisation non covalente des CNTs ont été, au même titre que les modifications covalentes, abondamment étudiées ces dernières années pour rendre soluble les CNTs ou encore leur ajouter des fonctionnalités. Leur avantage majeur par rapport à la création d'un lien covalent réside dans le fait qu'elles n'altèrent pas les propriétés de ces derniers, notamment leur propriété de conducteur métallique ou semi-conducteur. De nombreuses techniques se basent donc aujourd'hui sur ce concept. Certaines se basent sur les interactions  $\pi$ - $\pi$  de petites molécules à caractère aromatique, d'autres sur la modification par des polymères et enfin sur la fonctionnalisation par des biomacromolécules<sup>216</sup>. Cette dernière sera développée plus précisément pour l'immobilisation d'enzymes rédox à la surface des CNTs.

Les petites molécules aromatiques comportant d'importants systèmes électroniques conjugués comme les dérivés pyrène, anthracène ou encore porphyrine par exemple, on la propriété d'interagir fortement avec les parois des CNTs par interaction  $\pi$ - $\pi$  ou «  $\pi$ -stacking » (Figure I.23).

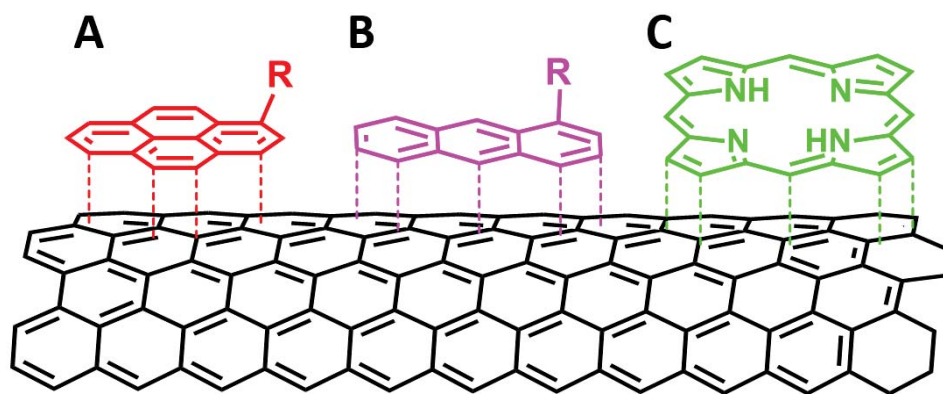


Figure I.23 : Interaction de  $\pi$ -stacking entre des composés polyaromatiques et la paroi des CNTs A) dérivé pyrène B) dérivé anthracène C) dérivé porphyrine

Ce phénomène d'adsorption de ces composés par interactions hydrophobes permet une fonctionnalisation efficace et particulièrement simple des CNTs. Cette méthode de greffage permet donc d'ajouter de nombreuses propriétés aux CNTs comme une meilleure solubilité ou

ajouter des groupements fonctionnels pour le greffage d'autres entités. Un exemple marquant a été décrit en 2001 par le groupe de Dai dans lequel les CNTs sont modifiés par incubation d'un dérivé pyrène porteur d'une fonction ester activé (N-hydroxysuccinimide, NHS) permettant ensuite le greffage covalent de protéines à la surface des CNTs par couplage peptique<sup>217</sup>. Il est évidemment possible de faire varier la fonction chimique portée par l'entité adsorbée sur les CNTs ce qui ouvre de larges possibilités de fonctionnalisation de surface avec de nombreuses espèces chimiques et biologiques (Figure I.24).

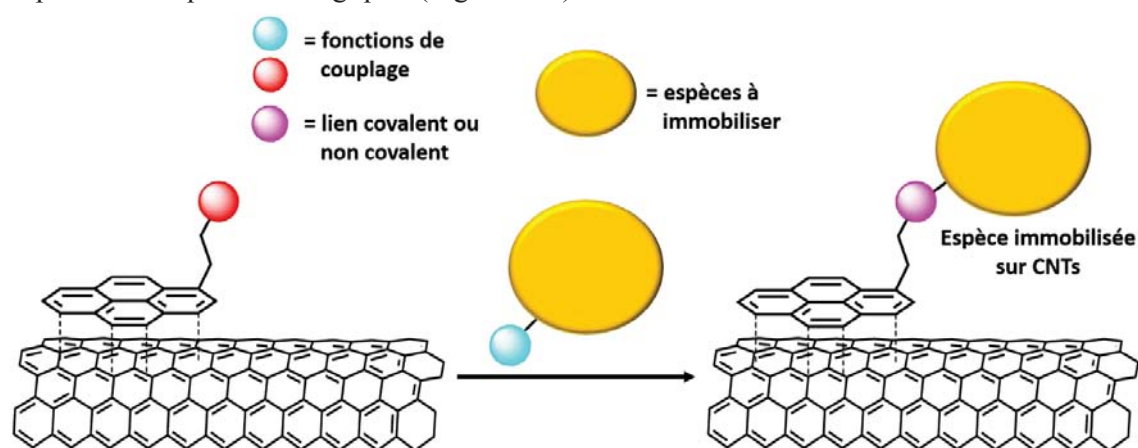


Figure I.24 : Schéma représentatif de du greffage covalent ou non covalent d'une entité chimique ou biologique sur des CNTs fonctionnalisés de manière non covalente

Par ce procédé les CNTs ont été fonctionnalisés par une vaste gamme de dérivés conférant aux CNTs des propriétés remarquables. Guldi et al. par exemple ont pu élaborer un nouveau système de nanohybrides donneur-accepteur d'électrons par l'interaction d'un pyrène ammonium immobilisé sur les CNTs avec des fonctions carboxylates présentes sur une porphyrine de zinc<sup>218</sup>. Le système CNTs/pyrène-NHS est toujours abondamment utilisé pour l'immobilisation covalente d'espèce portant une fonction amine, notamment les protéines<sup>217,219</sup>. Plus précisément, concernant l'élaboration de bioélectrodes pour les biopiles ou les biocapteurs, cette technique permet également de greffer efficacement des médiateurs rédox à la surface des CNTs<sup>220</sup>. L'exemple particulièrement intéressant des interactions hôte-invité a également été étudié par cette méthode. L'immobilisation d'un dérivé pyrène-cyclodextrine (pyrène-CD) sur CNTs permet d'immobiliser par interactions supramoléculaires des entités portant des groupements hydrophobes capables de s'associer fortement à la cavité de la CD<sup>221</sup>. Le procédé inverse, immobilisant l'entité hydrophobe sur les CNTs dans un premier et reconnaissant une cible portant une CD, a également été décrit<sup>222</sup>. Des exemples de greffages de catalyseurs moléculaires par  $\pi$ -stacking ont également été envisagés<sup>223</sup>.

La seconde méthode de choix pour modifier les CNTs de manière non covalente consiste en l'utilisation de polymères organique ou inorganique. Les groupements d'intérêts portés par le polymère sont déterminants dans l'intégration de nouvelles propriétés au composites

CNTs/polymère. Comme précédemment, cette technique a été largement employée, pour solubiliser les CNTs. L'intégration au CNTs de nouvelles propriétés physicochimiques, électrochimiques, catalytiques grâce à différents types de polymères a également été abondamment décrite. Ces composites peuvent être obtenus par mélange du polymère avec une dispersion de CNTs, mais dans certain cas ils peuvent également être électrogénérés. L'électrogénération de polymère à la surface des CNTs est largement utilisée dans la conception d'électrode pour la conception de biopiles ou biocapteurs. Comme précédemment pour les interactions  $\pi$ - $\pi$ , de nombreuses fonctionnalités peuvent être intégrées au composite selon la nature du polymère utilisé. Les hydrogels d'osmium, présentés précédemment pour la médiation d'enzymes rédox, est un parfait exemple d'utilisation de composite CNTs/polymère pour la conception de bioélectrodes<sup>169</sup>.

### I.3.2 Les CNTs pour l'immobilisation et la connexion d'enzymes rédox dans les biopiles glucose-O<sub>2</sub> pour l'implantable

#### I.3.2.1 Electrodes à base de CNTs pour la connexion enzymatique

##### *I.3.2.1.1 L'immobilisation d'enzymes rédox sur CNTs*

L'immobilisation et la connexion sur électrodes des enzymes rédox utilisée dans la conception de biopiles glucose-O<sub>2</sub> sont deux paramètres cruciaux afin d'obtenir les meilleures performances possibles en matière de puissance, stabilité et biocompatibilité<sup>224</sup>.

L'immobilisation de la protéine va en effet influencer de nombreux paramètres. Comme détaillée dans la partie I.2, la méthode choisie pour greffer l'enzyme à la surface doit à la fois permettre une bonne diffusion du substrat jusqu'au site actif, ne pas engendrer de dénaturation de la protéine et enfin être stable dans le temps en empêchant la perte du matériel biologique de l'électrode.

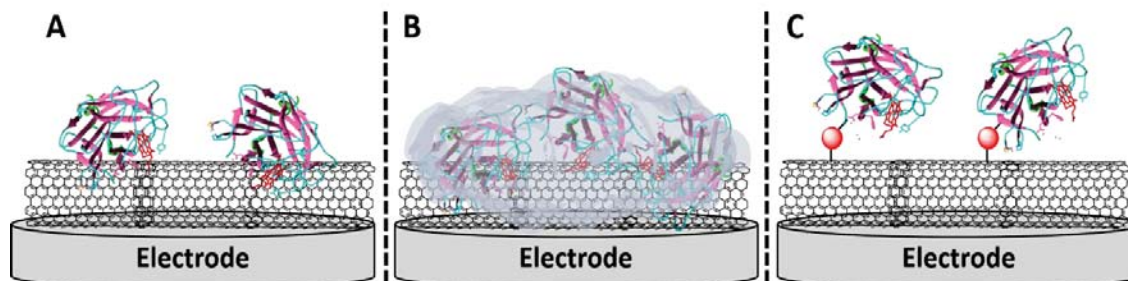


Figure I.25 : Principales méthodes d'immobilisation de protéines sur les CNTs A) adsorption non spécifique B) encapsulation dans une matrice polymérique C) greffage covalent

Parmi ces dernières, plusieurs sont fréquemment employées pour immobiliser des protéines à la surface de différents types de matériaux et plus particulièrement sur les CNTs (Figure I.25)<sup>90</sup>.



L'adsorption non spécifique de l'enzyme représente la plus simple alternative consistant à tirer avantage de l'hydrophobicité des CNTs pour déposer l'enzyme. Malgré sa simplicité, elle est limitée en matière de stabilité et peut éventuellement avoir un impact sur la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Une seconde méthode souvent employée consiste en l'encapsulation de la protéine à l'intérieur de matrices polymériques. Elle est souvent plus stable et permet la rétention d'un plus grand nombre de protéines qu'une simple adsorption mais peut avoir un impact sur la bonne diffusion des substrats et sur la structure de la biomolécule. La dernière, également très étudiée, consiste à greffer de manière non covalente l'enzyme sur les CNTs. Cette méthode se base sur toutes les techniques décrites précédemment sur les différentes techniques d'immobilisation covalente d'enzymes et sur la modification chimique des CNTs. L'immobilisation de la protéine est un paramètre prépondérant qui aura un impact majeur sur la durée de vie des bioélectrodes enzymatiques. Quelle que soit la méthode d'immobilisation, les CNTs permettent d'immobiliser de très grandes quantités de biocatalyseurs grâce à leur importante surface développée.

#### *1.3.2.1.2 Les propriétés de DET des CNTs*

La bonne connexion électrique entre la protéine et l'électrode est un élément indispensable à l'obtention de forts courants bioélectrocatalytiques. Comme expliqué dans la partie I.2.3.1, la recherche de l'obtention d'un DET efficace entre l'enzyme et l'électrode permet d'accroître la f.e.m de la pile tout en facilitant la préparation de l'électrode puisqu'elle ne nécessite pas la présence d'un médiateur redox.

Les CNTs, de par leurs propriétés conductrices et leur morphologie, interagissent particulièrement bien avec les protéines<sup>225</sup>. Ces aspects facilitent le transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode. En effet, certaines protéines dont le DET était difficile à obtenir ont pu être connectées grâce à leur incorporation au sein de matrices de CNTs. De même, pour les enzymes qui avaient déjà présentées des propriétés de transfert direct, les CNTs ont considérablement accru les performances de ces DET. Ceci peut être expliqué par la morphologie des matrices de CNTs et leur caractère tridimensionnelle facilitant le transfert électronique entre le site actif et l'électrode<sup>226</sup>. De plus, la surface développée de ces électrodes étant beaucoup plus importante qu'une électrode plane, elle permet d'inclure à la matrice de CNTs une plus large quantité d'enzymes menant à l'obtention de courants catalytiques beaucoup plus forts. Le cas des enzymes à cuivre comme la BOD et la Lac pour la réduction de O<sub>2</sub> sont tout à fait remarquables. Le DET de ces enzymes sur des électrodes plane de graphite donnait lieu à l'obtention de courants de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ <sup>118</sup>. Grâce à l'incorporation de ces MCOs au sein de matrice de CNTs les courants sont désormais de l'ordre de plusieurs centaines de  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ <sup>219</sup>.

#### *1.3.2.1.3 Le MET sur les électrodes à base de CNTs*

Les CNTs sont également intéressants pour l'élaboration de bioélectrode à transfert médié. En effet, comme décrit dans la partie I.3.1.3, les CNTs sont une plateforme idéale pour le greffage covalent ou non covalent de nombreuses structures. Comme pour les protéines, la large surface développée des CNTs permet l'intégration à la bioélectrode de larges concentrations de médiateurs sur trois dimensions, maximisant ainsi la probabilité d'échange électronique entre la protéine et le médiateur rédox au sein de la bioélectrode enzymatique.

#### *1.3.2.1.4 Les architectures d'électrodes à base de CNTs*

En outre, le développement de nouvelles architectures d'électrodes à bases de CNTs a aussi permis d'améliorer les performances des biopiles enzymatiques. Dans ce cas, les CNTs sont assemblés de manière cohérente afin d'optimiser la quantité de catalyseur possiblement intégrée au système tout en facilitant la diffusion des substrats vers les centres catalytiques. Ces architectures se basent sur l'intégration des CNTs à des matrices plus structurées autour de polymères, de nanomatériaux carbonés ou par simple assemblage de CNTs organisés pour former des électrodes tridimensionnelles puissantes. Ces nanostructures « hydrides » visant à augmenter les propriétés catalytiques des bioélectrodes tout en minimisant leur volume sont abondamment étudiées à l'heure actuelle. Récemment, Umasankar et al. ont développé l'une des cathodes les plus puissantes de la littérature à base de laccase en DET et de CNTs formant un « bucky paper » capable de délivrer des densités de courant pour la réduction du dioxygène de l'ordre de  $60 \text{ mA.cm}^{-2}$  à  $0,4 \text{ V}^{227}$ . En 2013, le groupe de Nishizawa a développé une anode à base de GOx et d'hydrogel d'osmium incorporés à un assemblage organisé de CNTs. Cette anode MET est capable de délivrer  $15 \text{ mA.cm}^{-2}$  à saturation en glucose (200 mM)<sup>171</sup>.

#### *1.3.2.2 Biopiles glucose-O<sub>2</sub> à base de CNTs*

Les propriétés des matrices de CNTs de pouvoir intégrer de larges quantités de matériel biologique tout en maximisant les chances de transfert électronique (direct ou indirect) ont fait d'eux un matériau de choix pour l'élaboration de biopiles enzymatiques. Le nombre de publications scientifiques se concentrant sur la conception de biopile enzymatique glucose-O<sub>2</sub> à base de CNTs est en pleine expansion ces dernières années.

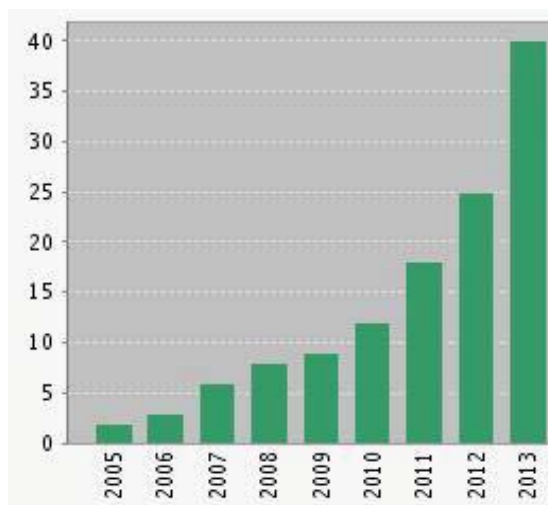


Figure I.26 : Evolution du nombre de publications sortie entre 2005 et 2013 concernant l'élaboration de biopiles enzymatique à base de CNTs. Recherche effectuée avec les mots clefs « enzymatic biofuel cell carbon nanotube ». Source [Web Of Knowledge](#)

Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux se sont focalisés sur l'amélioration des performances des biopiles glucose- $O_2$ . L'utilisation des CNTs a permis d'accroître très nettement les puissances de ces dispositifs. Les enzymes oxydant le glucose (décrites en partie I.1.3.2.2) et réduisant  $O_2$  (décrites en partie I.1.3.2.1) sont désormais intégrées dans des matrices de CNTs de plus en plus sophistiquées garantissant un excellent confinement de la protéine et un transfert électronique direct ou indirect optimisé. Une grande majorité des biopiles les plus puissantes à l'heure actuelle sont constituées de bioélectrodes à base de CNTs.

Une des premières biopiles enzymatique glucose- $O_2$ , constituée de bioélectrodes à l'anode et la cathode, a été décrite en 2006 par Yan et al<sup>228</sup>. Dans cette étude, l'oxydation du glucose à l'anode est effectuée par une GDH  $NAD^+$ -dépendante, le cofacteur  $NAD^+$  est régénéré à l'électrode SWCNTs recouverte d'un film de bleu de méthylène préalablement électropolymérisé. La cathode consiste en un simple dépôt (adsorption) de Lac sur la matrice de SWCNTs. Bien que de faibles puissances ait été obtenues ( $9,5 \mu W.cm^{-2}$ ) pour cette biopile, il s'agissait du premier exemple à base de CNTs. Peu de temps après, le même groupe a décrit une biopile glucose- $O_2$  similaire, utilisant la BOD à la cathode, capable de fonctionner dans du sérum biologique<sup>229</sup>. Depuis ces travaux, de nombreuses contributions ont décrit l'élaboration de biopiles glucose- $O_2$ , constituées de bioélectrodes enzymatiques à l'anode comme à la cathode (Tableau 3) <sup>17,128,170,171,228-243</sup>.

Bioanode	biocathode	[glucose] (mM)	$P_{MAX}$	f.e.m (V)	stabilité	Réf.
GDH MET: MB	Lac DET	30	$9,5 \mu W.cm^{-2}$	0,8	7 jours	228
GDH MET: pBCB	BOD DET	40 sérum	$53,9 \mu W.cm^{-2}$ $5 \mu W.cm^{-2}$	0,73 0,63	7 jours 12 heures	229

GDH MET: Fc	Lac MET: Fc	Jus de raisin	28,4 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,42	NC	231
GOx MET: FcMeOH	BOD MET: ABTS	100 mM	120 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,48	NC	232
GDH MET: NB	BOD DET	40	23 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,65	NC	233
GDH MET: AuNP	Lac DET	30 (10 mM NADH)	329 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,7	NC	234
GOx MET: PQQ	Lac MET: ABTS	NC	442 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	NC	NC	235
GDH MET: PQQ	BOD DET	20	23 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,6	4 heures	77
GOx MET: Os	BOD MET: Os	15	0,74 mW.cm <sup>-2</sup>	0,83	8 heures	170
GOx DET	Lac DET	50	1,25 mW.cm <sup>-2</sup>	0,93	30 jours	17
GDH MET: NB	Lac DET	40	32 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,85	NC	236
GDH MET: MG	Lac DET	NC	76 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,57	NC	237
GOx MET: DMFc	Lac DET	100	381 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,86	24 heures	238
GDH MET: AuNP	Lac DET	80	131 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,58	25 heures	128
GOx MET: Os	BOD DET	raisin	40 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,5	NC	171
GDH MET: MD	Lac DET	5	0,8 mW.cm <sup>-2</sup>	1,2	140 heures	240
GDH DET	BOD DET	10 sérum	140 $\mu\text{W.cm}^{-2}$ 41 $\mu\text{W.cm}^{-2}$	0,7 0,66	3 jours	241
GOx DET	Lac MET: ABTS	NC	2,3 mW.cm <sup>-2</sup>	1,2	30 jours	242
GOx MET: Os	BOD MET: Os	60 sérum	2,18 mW.cm <sup>-2</sup> 1,02 mW.cm <sup>-2</sup>	0,7	50 heures	243

Tableau 3 : tableau récapitulatif de résultats marquants de ces dernières années concernant l'élaboration de biopiles glucose-O<sub>2</sub> in vitro

Ces biopiles ont toutes été caractérisées *in vitro*, dans la plupart des cas. Les performances (densités de puissances, voltage et stabilité) de ces biopiles sont donc obtenues dans des conditions optimales de fonctionnement. De quelques  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  en 2006, les biopiles glucose- $\text{O}_2$  les plus récentes permettent aujourd'hui d'obtenir des densités de puissances se rapprochant du  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ . De plus, dans certains cas, les auteurs présentent des expériences en conditions proches du milieu physiologique donnant accès à des valeurs se rapprochant de celles qui pourraient être obtenues dans le cas de l'implantation de leurs systèmes chez l'animal. Les manipulations *in vivo* sont encore rares mais constituent l'un des défis majeurs à relever dans l'optique de développer un jour des dispositifs biomédicaux auto-alimentés.

## 1.4 Implantations des biopiles glucose- $\text{O}_2$

L'alimentation de dispositifs médicaux implantables représente la majorité des applications envisagées pour les biopiles glucose- $\text{O}_2$ . Leur principe de fonctionnement représente une véritable alternative aux batteries, à durée de vie finie, actuellement utilisées dans ce domaine. La possibilité de faire fonctionner un pacemaker, un organe artificiel, une pompe à insuline ou même un capteur de glycémie grâce à des « carburants » directement présent chez le patient et en concentration sans cesse renouvelée représente un véritable défi<sup>57</sup>.

Comme présenté précédemment, ce défi est relevé actuellement par différents groupes à travers le monde qui travaillent à l'optimisation des dispositifs de biopiles enzymatiques à glucose pour obtenir des puissances toujours plus importantes dans des conditions toujours plus proches du milieu physiologique. Evidemment, les limitations de ce milieu sont grandes<sup>244</sup>. La concentration en substrats y est limitée ( $[\text{glucose}] = 5 \text{ mM}$  et  $[\text{O}_2] = 45 \mu\text{M}$ ). Le pH neutre et la présence de nombreuses autres substances peuvent avoir un impact négatif sur les performances de la biopile de manière instantanée ou sur une durée prolongée comme par exemple les ions  $\text{Cl}^-$  présents à  $150 \text{ mM}$  et pouvant inhiber la Lac. Les manipulations *in vivo* impliquent également de travailler avec des dispositifs de pile biocompatibles. Ceci implique que l'architecture de la pile n'ait aucun impact sur la vie de l'animal ou, plus tard du patient. C'est pourquoi tous les éléments inclus au sein de la bioélectrode doivent être immobilisés ; les électrodes doivent avoir elles aussi une excellente stabilité mécaniques ; ces dernières sont bien souvent isolées du milieu biologique par une membrane protectrice. Outre la stabilité mécanique, la stabilité des composants de la biopile (enzymes, médiateurs, membrane de confinement) peuvent être limitante une fois implantés.

Prenant en compte ces paramètres, sur la quantité de travaux développés visant à améliorer les biopiles glucose- $\text{O}_2$  à base de CNTs, une très faible partie d'entre eux s'avère en réalité applicable pour des mesures *in vivo*. Cependant, depuis 4 ans, des résultats intéressants ont pu être décrits dans la littérature concernant l'implantation de biopiles enzymatiques glucose- $\text{O}_2$  au

sein d'organismes vivants. Plus récemment encore, des expériences d'alimentation de dispositifs à très faibles demandes énergétiques ont été réalisées<sup>57,245</sup>.

En réalité, les premières manipulations d'implantations de piles à combustibles dans un animal son assez anciennes. Des expériences menées dans les années 1970 se sont focalisées sur l'implantation de dispositifs abiotiques, à base de métaux nobles ou de catalyseurs moléculaires. En 1970, une des toutes premières implantations d'une pile à combustible a été implantée dans un chien par l'équipe de Matsuda<sup>246</sup>. La PAC à base de métaux noble délivrait alors  $2,2 \mu\text{W.cm}^{-2}$  pendant 30 jours. Une expérience similaire menée dans un mouton a permis d'obtenir  $40 \mu\text{W.cm}^{-2}$  mais avec une stabilité n'excédant pas l'heure. Les faibles densités de courants et les très courtes stabilités, dû à la non spécificité des électrodes et aux réactions inflammatoires liées à l'implantation sont de nombreuses raisons pouvant expliquer pourquoi ces dispositifs ont été abandonnés pendant plusieurs décennies.

Les grandes avancées réalisées, au cours de la dernière décennie, en matière d'élaboration de bioélectrodes enzymatiques ont relancé le défi de développer des piles implantées chez les êtres vivants<sup>2,34,39,40,247</sup>. Les travaux décrivant la possibilité de générer un courant électrique à partir d'un organisme vivant se sont d'abords focalisés sur l'utilisation d'organismes végétaux. Après plusieurs années de développement des hydrogels d'osmium pour la connexion de protéines rédox, N. Mano et al. décrivent en 2003 la possibilité de générer  $2,4 \mu\text{W}$  à partir d'une biopile enzymatique située dans un grain de raisin<sup>58</sup>. Par la suite, le groupe de Nishizama décrivent également plusieurs biopiles opérationnelles dans un raisin, basées sur des nanostructures à base de CNTs<sup>171,248,249</sup>. L'une des plus puissantes de ces biopiles se base sur l'oxydation du fructose présent dans le grain de raisin et permet de délivrer une puissance de l'ordre de  $1,6 \text{ mW.cm}^{-2}$ .

Chez les animaux, l'opération est plus difficile puisqu'elle consiste à implanter une pile, souvent reliée par des fils pour le suivi des performances dans le corps d'un organisme capable de mouvement. En outre, les processus de « rejet » (réaction inflammatoires, nécroses des tissus) peuvent freiner ces manipulations, impactant l'état de santé de l'animal et par conséquent l'état de fonctionnement de la biopile implantée.

La première implantation dans un mammifère d'une biopile opérationnelle a été réalisée en 2010 au sein du groupe de Serge Cosnier, en collaboration avec l'équipe de P. Cinquin. La biopile implantée dans un rat était alors composée d'électrode de graphite élaborée par compression mécanique d'un mélange de graphite, d'enzymes (GOx et PPO) et de médiateurs rédox (ubiquinone à l'anode et hydroquinone à la cathode)<sup>250</sup>. Elle a permis l'obtention de puissances maximales de l'ordre de  $6 \mu\text{W}$  ( $24 \mu\text{W.mL}^{-1}$ ) et de produire une puissance stable pendant plusieurs jours de  $2 \mu\text{W}$  ( $7,5 \mu\text{W.mL}^{-1}$ ). Ce fut la première implantation couronnée de succès chez un mammifère d'une biopile enzymatique. Ces travaux furent pionniers en matière

d'implantation dans un animal et furent suivis d'autres résultats dans d'autres organismes (Tableau 4).

Organisme	matériau	biopile	$P_{\max}$	dispositif	stabilité	Réf
<b>Raisin</b>	Fibre de carbone	GOx (MET) BOD (MET)	$430 \mu\text{W.cm}^{-2}$	/	1 semaine	58
<b>Raisin</b>	CNTF	GOx (MET) BOD (DET)	$1,75 \text{ mW.cm}^{-2}$	diode	NC	171
<b>Rat</b>	graphite	GOx (MET) PPO (MET)	$1,5 \mu\text{W.cm}^{-2}$	/	11 jours	250
<b>Lapin</b>	Ketjen black	GDH (MET) BOD (DET)	$1,31 \text{ mW.cm}^{-2}$	/	NC	249
<b>Blatte</b>	Tige de carbone	TOx/GOx (MET) BOD (MET)	$55 \mu\text{W.cm}^{-2}$	/	2,5 heures	251
<b>Escargot</b>	CNTs	GDH-PQQ (DET) Lac (DET)	$30 \mu\text{W.cm}^{-2}$	/	2 semaines	252
<b>Palourde</b>	CNTs	GDH-PQQ (DET) Lac (DET)	$5,2 \mu\text{W.cm}^{-2}$ $40 \mu\text{W.cm}^{-2}$	Petit moteur	NC	253
<b>Homard</b>	CNTs	GDH-PQQ (DET) Lac (DET)	$0,64 \text{ mW.cm}^{-2}$	Montre digitale	NC	254
<b>Rat</b>	CNTs	GOx (DET) Lac (DET)	$193 \mu\text{W.cm}^{-2}$	diode	9 jours	59
<b>Rat</b>	CNTs	GDH-PQQ (DET) Lac (DET)	$0,17 \mu\text{W.cm}^{-2}$	/	NC	255

Tableau 4 : tableau récapitulatifs des implantations de biopiles glucose- $\text{O}_2$

En 2011, Miyake et al. ont décrit l'implantation partielle (uniquement le compartiment anodique) d'une biopile glucose- $\text{O}_2$  dans l'oreille d'un lapin. Le compartiment cathodique externe permet de contourner la limitation de la concentration en  $\text{O}_2$  dans le milieu physiologique ( $200 \mu\text{M}$ )<sup>249</sup>. Cette même année, le groupe de Scherson a publié l'implantation d'une biopile dans une blatte permettant l'obtention de  $55 \mu\text{W.cm}^{-2}$ . Le système est basé sur la connexion de la trehalose oxydase et de la GOx à l'anode par un hydrogel d'osmium et de la BOD par un autre hydrogel d'osmium à la cathode<sup>251</sup>. La pile dans l'insecte possède une stabilité de plusieurs heures en fonctionnement.

Une année plus tard, les premières biopiles enzymatiques à bases de CNTs ont été directement implantées dans divers types d'animaux. Ces biopiles, aux surfaces développées d'électrodes plus grandes ont permis l'obtention de puissances plus importantes.



Le groupe de Katz notamment a été particulièrement actif dans le développement de ces systèmes. En 2012, ce dernier a publié deux études dans lesquelles il décrit l'implantation de biopiles à combustibles à glucose à base de CNTs dans un escargot puis une palourde<sup>252,253</sup>. Ces deux biopiles étaient toutes deux composées de GDH-PQQ connecté directement à l'anode et de laccase à la cathode. Le matériau d'électrode était un « buckypaper » de CNTs. La puissance maximale dans l'escargot était de  $30 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$  et dans la palourde de  $5,2 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$ . Avec la mise en série de 3 palourdes « électrifiées », ce groupe a pour l'une des première fois démontré l'alimentation d'un dispositif à faible demande énergétique

Avec ce dernier résultat, l'implantation d'une biopile glucose- $\text{O}_2$  dans les animaux a franchi une nouvelle étape : l'alimentation d'un dispositif grâce à l'énergie chimique de l'organisme convertie en courant électrique. En 2013, le groupe de Katz toujours et le groupe de Cosnier ont publiés chacun un article décrivant la encore l'alimentation d'appareils électriques à faible demande énergétique grâce à une biopile enzymatique à glucose implantée. Le premier décrit l'implantation de la même biopile, décrite dans le cas de l'escargot et la palourde, dans un homard. Grâce à deux animaux implantés branchés en série cette équipe a pu faire fonctionner une montre digitale<sup>254</sup>. Le second a implanté une pile à base de GOx et de Lac connectée par DET dans une matrice de CNTs compressée mécaniquement dans le corps d'un rat<sup>59</sup>. Cette biopile a permis l'alimentation d'une diode et d'un thermomètre électronique et délivrait une puissance maximale de l'ordre de  $160 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$ .

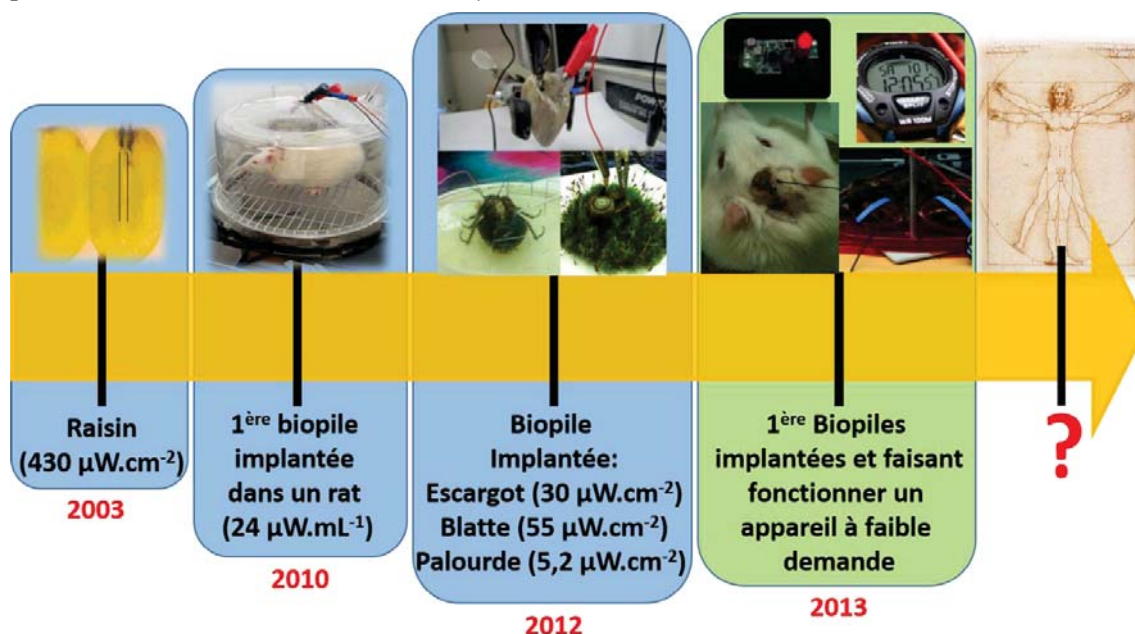


Figure I.27 : frise historique de l'évolution des biopiles enzymatiques glucose- $\text{O}_2$  implantées dans des organismes vivants

Tous ces travaux décrivant le fonctionnement de biopiles enzymatiques glucose- $\text{O}_2$  fonctionnant à l'intérieur d'un organisme vivant ont permis de dépasser une barrière technologique (Figure I.27). De plus, les travaux décrivant la possibilité de générer



suffisamment de courant pour permettre l'alimentation de dispositifs à faibles demandes énergétiques sont un pas de plus vers d'éventuelles applications biomédicales. Cependant, avant de pouvoir réellement trouver une application à ces systèmes, les performances doivent encore être améliorées. En particulier, les électrodes doivent pouvoir être stables sur des durées suffisamment longues (années) pour pouvoir représenter une véritable alternative aux batteries rechargeables. Au contraire des batteries, la nécessité de ces biopiles d'être en contact avec les fluides physiologiques représentent également un challenge au niveau de la biocompatibilité de ces dispositifs implantés et dans leur éventuelle commercialisation.

1. M. Winter and R. J. Brodd, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 4245–4270.
2. J. A. Cracknell, K. A. Vincent, and F. A. Armstrong, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2439–2461.
3. W. R. Grove, *Philos. Mag. Ser. 3*, 1839, **14**, 127–130.
4. C. F. Schœnbein, *Philos. Mag. Ser. 3*, 1839, **14**, 43–45.
5. B. C. H. Steele and A. Heinzl, *Nature*, 2001, **414**, 345–352.
6. K. Haga, S. Adachi, Y. Shiratori, K. Itoh, and K. Sasaki, *Solid State Ion.*, 2008, **179**, 1427–1431.
7. W.-M. Yan, H.-S. Chu, M.-X. Lu, F.-B. Weng, G.-B. Jung, and C.-Y. Lee, *J. Power Sources*, 2009, **188**, 141–147.
8. J. Zhang, K. Sasaki, E. Sutter, and R. R. Adzic, *Science*, 2007, **315**, 220–222.
9. K. Sasaki, H. Naohara, Y. Cai, Y. M. Choi, P. Liu, M. B. Vukmirovic, J. X. Wang, and R. R. Adzic, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 8602–8607.
10. A. T. Yahiro, S. M. Lee, and D. O. Kimble, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Spec. Sect. Biophys. Subj.*, 1964, **88**, 375–383.
11. K. A. Vincent, A. Parkin, and F. A. Armstrong, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4366–4413.
12. A. F. Wait, A. Parkin, G. M. Morley, L. dos Santos, and F. A. Armstrong, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 12003–12009.
13. Y.-M. Yan, I. Baravik, R. Tel-Vered, and I. Willner, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 4275–4279.
14. R. L. Arechederra and S. D. Minteer, *Fuel Cells*, 2009, **9**, 63–69.
15. Y. H. Kim, E. Campbell, J. Yu, S. D. Minteer, and S. Banta, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 1437–1440.
16. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, 2008, **2**, 133–138.
17. A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, and S. Cosnier, *Nat. Commun.*, 2011, **2**, 370.
18. R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman, and F. C. Walsh, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 2015–2045.
19. R. M. Allen and H. P. Bennetto, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1993, **39-40**, 27–40.
20. K. Rabaey and W. Verstraete, *Trends Biotechnol.*, 2005, **23**, 291–298.
21. B. E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, and K. Rabaey, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 5181–5192.
22. Z. Du, H. Li, and T. Gu, *Biotechnol. Adv.*, 2007, **25**, 464–482.
23. O. Schaetzle, F. Barrière, and K. Baronian, *Energy Environ. Sci.*, 2008, **1**, 607–620.
24. D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels, and K. Vanbroekhoven, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, 1533–1543.
25. F. Zhao, F. Harnisch, U. Schröder, F. Scholz, P. Bogdanoff, and I. Herrmann, *Electrochem. Commun.*, 2005, **7**, 1405–1410.
26. S. Cheng, H. Liu, and B. E. Logan, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 364–369.
27. A. Bergel, D. Féron, and A. Mollica, *Electrochem. Commun.*, 2005, **7**, 900–904.
28. K. Rabaey, S. T. Read, P. Clauwaert, S. Freguia, P. L. Bond, L. L. Blackall, and J. Keller, *ISME J.*, 2008, **2**, 519–527.
29. O. Schaetzle, F. Barrière, and U. Schröder, *Energy Environ. Sci.*, 2008, **2**, 96–99.
30. R. L. Arechederra, K. Boehm, and S. D. Minteer, *Electrochimica Acta*, 2009, **54**, 7268–7273.

31. R. Arechederra and S. D. Minter, *Electrochimica Acta*, 2008, **53**, 6698–6703.
32. M. J. Moehlenbrock, T. K. Toby, A. Waheed, and S. D. Minter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6288–6289.
33. D. Bhatnagar, S. Xu, C. Fischer, R. L. Arechederra, and S. D. Minter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **13**, 86–92.
34. M. J. Cooney, V. Svoboda, C. Lau, G. Martin, and S. D. Minter, *Energy Environ. Sci.*, 2008, **1**, 320–337.
35. S. D. Minter, B. Y. Liaw, and M. J. Cooney, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18**, 228–234.
36. D. Leech, P. Kavanagh, and W. Schuhmann, *Electrochimica Acta*, 2012, **84**, 223–234.
37. E. Katz, A. F. Bückmann, and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 10752–10753.
38. M. Zhou and S. Dong, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 1232–1243.
39. S. Calabrese Barton, J. Gallaway, and P. Atanassov, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 4867–4886.
40. I. Willner, Y.-M. Yan, B. Willner, and R. Tel-Vered, *Fuel Cells*, 2009, **9**, 7–24.
41. E. I. Solomon, U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2563–2606.
42. S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas, and L. Gorton, *Bioelectrochemistry*, 2005, **67**, 115–124.
43. N. Mano, H.-H. Kim, Y. Zhang, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6480–6486.
44. F. Giroud, C. Gondran, K. Gorgy, V. Vivier, and S. Cosnier, *Electrochimica Acta*, 2012, **85**, 278–282.
45. E. Katz, O. Lioubashevski, and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 3979–3988.
46. A. L. De Lacey, V. M. Fernández, M. Rousset, and R. Cammack, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4304–4330.
47. K. A. Vincent, J. A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, and F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 16951–16954.
48. M.-E. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron-Infossi, E. Lojou, P. Bertrand, C. Léger, M.-T. Giudici-Orticoni, and W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6991–7004.
49. A. Ciaccafava, A. De Poulpiquet, V. Techer, M. T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent, and E. Lojou, *Electrochem. Commun.*, 2012, **23**, 25–28.
50. S. Krishnan and F. A. Armstrong, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 1015–1023.
51. N. Plumeré, O. Rüdiger, A. A. Oughli, R. Williams, J. Vivekananthan, S. Pöller, W. Schuhmann, and W. Lubitz, *Nat. Chem.*, 2014, **6**, 822–827.
52. C. Gomez, S. Shipovskov, and E. E. Ferapontova, *J. Renew. Sustain. Energy*, 2010, **2**, 013103.
53. U. B. Jensen, S. Lörcher, M. Vagin, J. Chevallier, S. Shipovskov, O. Koroleva, F. Besenbacher, and E. E. Ferapontova, *Electrochimica Acta*, 2012, **62**, 218–226.
54. K. Elouarzaki, A. Le Goff, M. Holzinger, J. Thery, and S. Cosnier, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 14078–14085.
55. M. Falk, C. W. Narváez Villarrubia, S. Babanova, P. Atanassov, and S. Shleev, *ChemPhysChem*, 2013, **14**, 2045–2058.
56. E. Katz, *Implantable Bioelectronics*, John Wiley & Sons, 2014.
57. S. Cosnier, A. Le Goff, and M. Holzinger, *Electrochem. Commun.*, 2014, **38**, 19–23.
58. N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 6588–6594.

59. A. Zebda, S. Cosnier, J.-P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, and P. Cinquin, *Sci. Rep.*, 2013, **3**.
60. N. Hakulinen, L.-L. Kiiskinen, K. Kruus, M. Saloheimo, A. Paananen, A. Koivula, and J. Rouvinen, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2002, **9**, 601–605.
61. S.-K. Lee, S. D. George, W. E. Antholine, B. Hedman, K. O. Hodgson, and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6180–6193.
62. M. R. Tarasevich, A. I. Yaropolov, V. A. Bogdanovskaya, and S. D. Varfolomeev, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1979, **104**, 393–403.
63. D. Ivnitski and P. Atanasov, *Electroanalysis*, 2007, **19**, 2307–2313.
64. S. Riva, *Trends Biotechnol.*, 2006, **24**, 219–226.
65. O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev, and A. I. Yaropolov, *Biochem. Mosc.*, 2007, **72**, 1136–1150.
66. J. A. Cracknell, T. P. McNamara, E. D. Lowe, and C. F. Blanford, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 6668–6675.
67. N. Mano and L. Edembe, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **50**, 478–485.
68. C. Kang, H. Shin, Y. Zhang, and A. Heller, *Bioelectrochemistry*, 2004, **65**, 83–88.
69. L. Edembe, S. Gounel, M. Cadet, F. Durand, and N. Mano, *Electrochem. Commun.*, 2012, **23**, 80–82.
70. J. Wang, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 814–825.
71. S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, *Biotechnol. Adv.*, 2009, **27**, 489–501.
72. G. Wohlfahrt, S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H. M. Kalisz, and H.-J. Hecht, *Acta Crystallogr. Sect. D*, 1999, **55**, 969–977.
73. V. Leskovac, S. Trivić, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, and D. Peričin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, **37**, 731–750.
74. A. PrévotEAU, O. Courjean, and N. Mano, *Electrochem. Commun.*, 2010, **12**, 213–215.
75. A. Oubrie, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, A. J. J. Olsthoorn, J. A. Duine, and B. W. Dijkstra, *EMBO J.*, 1999, **18**, 5187–5194.
76. I. W. Schubart, G. Göbel, and F. Lisdat, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 224–232.
77. C. Tanne, G. Göbel, and F. Lisdat, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 530–535.
78. V. Flexer, F. Durand, S. Tsujimura, and N. Mano, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 5721–5727.
79. C. Sygmund, P. Staudigl, M. Klausberger, N. Pinotsis, K. Djinović-Carugo, L. Gorton, D. Haltrich, and R. Ludwig, *Microb. Cell Factories*, 2011, **10**, 106.
80. M. N. Zafar, N. Beden, D. Leech, C. Sygmund, R. Ludwig, and L. Gorton, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 2069–2077.
81. M. D. Cameron and S. D. Aust, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 129–138.
82. G. Henriksson, G. Johansson, and G. Pettersson, *J. Biotechnol.*, 2000, **78**, 93–113.
83. L. Stoica, N. Dimcheva, Y. Ackermann, K. Karnicka, D. A. Guschin, P. J. Kulesza, J. Rogalski, D. Haltrich, R. Ludwig, L. Gorton, and W. Schuhmann, *Fuel Cells*, 2009, **9**, 53–62.
84. S. Timur, Y. Yigzaw, and L. Gorton, *Sens. Actuators B Chem.*, 2006, **113**, 684–691.
85. C. K. Peterbauer and J. Volc, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 837–848.

86. F. Tasca, L. Gorton, M. Kujawa, I. Patel, W. Harreither, C. K. Peterbauer, R. Ludwig, and G. Nöll, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**, 1710–1716.
87. M. N. Zafar, F. Tasca, S. Boland, M. Kujawa, I. Patel, C. K. Peterbauer, D. Leech, and L. Gorton, *Bioelectrochemistry*, 2010, **80**, 38–42.
88. P. N. Bartlett, *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, John Wiley & Sons, 2008.
89. F. A. Armstrong and G. S. Wilson, *Electrochimica Acta*, 2000, **45**, 2623–2645.
90. A. K. Sarma, P. Vatsyayan, P. Goswami, and S. D. Minteer, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 2313–2322.
91. F. M. Richards and J. R. Knowles, *J. Mol. Biol.*, 1968, **37**, 231–233.
92. M. I, D. C, B. Mj, and W. Kc, *BioTechniques*, 2004, **37**, 790–6, 798–802.
93. T. de Lumley-Woodyear, P. Rocca, J. Lindsay, Y. Dror, A. Freeman, and A. Heller, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 1332–1338.
94. P. Ó Conghaile, S. Pöller, D. MacAodha, W. Schuhmann, and D. Leech, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **43**, 30–37.
95. B. Krajewska, *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, **35**, 126–139.
96. T. Klotzbach, M. Watt, Y. Ansari, and S. D. Minteer, *J. Membr. Sci.*, 2006, **282**, 276–283.
97. S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, 1999, **14**, 443–456.
98. S. Cosnier, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2000, **89**, 127–138.
99. S. Cosnier, *Anal. Lett.*, 2007, **40**, 1260–1279.
100. D. Samanta and A. Sarkar, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 2567–2592.
101. R. Villalonga, R. Cao, and A. Frago, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 3088–3116.
102. G. V. Dubacheva, A. Van Der Heyden, P. Dumy, O. Kaftan, R. Auzély-Velty, L. Coche-Guerente, and P. Labbé, *Langmuir*, 2010, **26**, 13976–13986.
103. M. Holzinger, L. Bouffier, R. Villalonga, and S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 1128–1134.
104. S. Takahashi, K. Sato, and J. Anzai, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 1749–1758.
105. N. Haddour, S. Cosnier, and C. Gondran, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 5752–5753.
106. M. Holzinger, A. L. Goff, and S. Cosnier, *New J. Chem.*, 2014.
107. L. S. Wong, F. Khan, and J. Micklefield, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4025–4053.
108. M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, and R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 11790–11791.
109. F. Rusmini, Z. Zhong, and J. Feijen, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1775–1789.
110. A. I. Yaropolov, M. R. Tarasevich, and S. D. Varfolomeev, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1978, **5**, 18–24.
111. F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, and N. J. Walton, *Acc. Chem. Res.*, 1988, **21**, 407–413.
112. L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas, and I. Gazaryan, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **400**, 91–108.
113. A. Christenson, N. Dimcheva, E. E. Ferapontova, L. Gorton, T. Ruzgas, L. Stoica, S. Shleev, A. I. Yaropolov, D. Haltrich, R. N. F. Thorneley, and S. D. Aust, *Electroanalysis*, 2004, **16**, 1074–1092.
114. A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M. T. Giudici-Orticoni, and E. Lojou, *Angew. Chem.*, 2012, **124**, 977–980.

115. M. Falk, Z. Blum, and S. Shleev, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 191–202.
116. P. Kavanagh and D. Leech, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 4859–4869.
117. F. Mao, N. Mano, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4951–4957.
118. S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, and L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 2517–2554.
119. S. Shleev, A. Christenson, V. Serezhenkov, D. Burbaev, A. Yaropolov, L. Gorton, and T. Ruzgas, *Biochem. J.*, 2005, **385**, 745.
120. C. Vaz-Dominguez, S. Campuzano, O. Rüdiger, M. Pita, M. Gorbacheva, S. Shleev, V. M. Fernandez, and A. L. De Lacey, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, **24**, 531–537.
121. C. Gutiérrez-Sánchez, W. Jia, Y. Beyl, M. Pita, W. Schuhmann, A. L. De Lacey, and L. Stoica, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 218–223.
122. H. L. Pang, J. Liu, D. Hu, X. H. Zhang, and J. H. Chen, *Electrochimica Acta*, 2010, **55**, 6611–6616.
123. C. Gutiérrez-Sánchez, M. Pita, C. Vaz-Domínguez, S. Shleev, and A. L. De Lacey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 17212–17220.
124. T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, and C. Mougin, *Biochemistry (Mosc.)*, 2002, **41**, 7325–7333.
125. C. F. Blanford, R. S. Heath, and F. A. Armstrong, *Chem. Commun.*, 2007, 1710–1712.
126. M. Sosna, L. Stoica, E. Wright, J. D. Kilburn, W. Schuhmann, and P. N. Bartlett, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 11882–11885.
127. N. Lalaoui, K. Elouarzaki, A. L. Goff, M. Holzinger, and S. Cosnier, *Chem. Commun.*, 2013.
128. M. Karaškievycz, E. Nazaruk, K. Żelechowska, J. F. Biernat, J. Rogalski, and R. Bilewicz, *Electrochem. Commun.*, 2012, **20**, 124–127.
129. S. Shleev, A. El Kasmi, T. Ruzgas, and L. Gorton, *Electrochem. Commun.*, 2004, **6**, 934–939.
130. M. C. Weigel, E. Tritscher, and F. Lisdat, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 689–693.
131. L. dos Santos, V. Climent, C. F. Blanford, and F. A. Armstrong, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 13962–13974.
132. C. H. Kjaergaard, F. Durand, F. Tasca, M. F. Qayyum, B. Kauffmann, S. Gounel, E. Suraniti, K. O. Hodgson, B. Hedman, N. Mano, and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 5548–5551.
133. P. Ramírez, N. Mano, R. Andreu, T. Ruzgas, A. Heller, L. Gorton, and S. Shleev, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, 2008, **1777**, 1364–1369.
134. Y. Ulyanova, S. Babanova, E. Pinchon, I. Matanovic, S. Singhal, and P. Atanasov, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 13367–13375.
135. G. T. R. Palmore and H.-H. Kim, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, **464**, 110–117.
136. K. Karnicka, K. Miecznikowski, B. Kowalewska, M. Skunik, M. Opallo, J. Rogalski, W. Schuhmann, and P. J. Kulesza, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 7643–7648.
137. M. Bourourou, K. Elouarzaki, M. Holzinger, C. Agnès, A. L. Goff, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M. Party, A. Maaref, and S. Cosnier, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 2885–2888.
138. A. Heller, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 664–672.
139. D. A. Guschin, J. Castillo, N. Dimcheva, and W. Schuhmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 1661–1673.
140. N. Mano, V. Soukharev, and A. Heller, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 11180–11187.



141. P. Kavanagh, S. Boland, P. Jenkins, and D. Leech, *Fuel Cells*, 2009, **9**, 79–84.
142. Y. Beyl, D. A. Guschin, S. Shleev, and W. Schuhmann, *Electrochem. Commun.*, 2011, **13**, 474–476.
143. S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, and T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **496**, 69–75.
144. S. Boland, P. Jenkins, P. Kavanagh, and D. Leech, *J. Electroanal. Chem.*, 2009, **626**, 111–115.
145. D. Ivnitski, B. Branch, P. Atanassov, and C. Apblett, *Electrochem. Commun.*, 2006, **8**, 1204–1210.
146. A. Salimi, E. Sharifi, A. Noorbakhsh, and S. Soltanian, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 3146–3153.
147. D. Ivnitski, K. Artyushkova, R. A. Rincón, P. Atanassov, H. R. Luckarift, and G. R. Johnson, *Small*, 2008, **4**, 357–364.
148. R. Gao and J. Zheng, *Electrochem. Commun.*, 2009, **11**, 608–611.
149. Y. Degani and A. Heller, *J. Phys. Chem.*, 1987, **91**, 1285–1289.
150. J. M. Goran, S. M. Mantilla, and K. J. Stevenson, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1571–1581.
151. O. Courjean, F. Gao, and N. Mano, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 5897–5899.
152. H. M. Kalisz, J. Hendle, and R. D. Schmid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, **47**, 502–507.
153. J. T. Holland, C. Lau, S. Brozik, P. Atanassov, and S. Banta, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 19262–19265.
154. J. Okuda and K. Sode, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, **314**, 793–797.
155. M. Zayats, E. Katz, R. Baron, and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12400–12406.
156. F. Durand, C. Stines-Chaumeil, V. Flexer, I. André, and N. Mano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **402**, 750–754.
157. K. Mori, M. Nakajima, K. Kojima, K. Murakami, S. Ferri, and K. Sode, *Biotechnol. Lett.*, 2011, **33**, 2255–2263.
158. O. Yehezkeli, R. Tel-Vered, S. Raichlin, and I. Willner, *ACS Nano*, 2011, **5**, 2385–2391.
159. F. Tasca, L. Gorton, W. Harreither, D. Haltrich, R. Ludwig, and G. Nöll, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 9956–9961.
160. F. Tasca, W. Harreither, R. Ludwig, J. J. Gooding, and L. Gorton, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 3042–3049.
161. R. Ortiz, H. Matsumura, F. Tasca, K. Zahma, M. Samejima, K. Igarashi, R. Ludwig, and L. Gorton, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 10315–10323.
162. V. Coman, R. Ludwig, W. Harreither, D. Haltrich, L. Gorton, T. Ruzgas, and S. Shleev, *Fuel Cells*, 2010, **10**, 9–16.
163. X. Wang, M. Falk, R. Ortiz, H. Matsumura, J. Bobacka, R. Ludwig, M. Bergelin, L. Gorton, and S. Shleev, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, **31**, 219–225.
164. Y. Degani and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 2357–2358.
165. B. A. Gregg and A. Heller, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 258–263.
166. W. Schuhmann, T. J. Ohara, H. L. Schmidt, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 1394–1397.
167. N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12962–12963.
168. F. Barrière, P. Kavanagh, and D. Leech, *Electrochimica Acta*, 2006, **51**, 5187–5192.



169. D. MacAodha, M. L. Ferrer, P. Ó. Conghaile, P. Kavanagh, and D. Leech, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 14667–14672.
170. F. Gao, L. Viry, M. Maugey, P. Poulin, and N. Mano, *Nat. Commun.*, 2010, **1**, 2.
171. S. Yoshino, T. Miyake, T. Yamada, K. Hata, and M. Nishizawa, *Adv. Energy Mater.*, 2013, **3**, 60–64.
172. M. Zayats, E. Katz, and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14724–14735.
173. E. Katz, L. Sheeney-Haj-Ichia, and I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 3292–3300.
174. V. Laurinavicius, J. Razumiene, A. Ramanavicius, and A. D. Ryabov, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, **20**, 1217–1222.
175. C. Lau, S. Borgmann, M. Maciejewska, B. Ngounou, P. Gründler, and W. Schuhmann, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 3014–3020.
176. M. N. Zafar, X. Wang, C. Sygmund, R. Ludwig, D. Leech, and L. Gorton, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 334–341.
177. R. L. McCreery, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2646–2687.
178. S. Iijima, *Nature*, 1991, **354**, 56–58.
179. M. Reibold, P. Paufler, A. A. Levin, W. Kochmann, N. Pätzke, and D. C. Meyer, *Nature*, 2006, **444**, 286–286.
180. S. Iijima and T. Ichihashi, *Nature*, 1993, **363**, 603–605.
181. J. M. Schnorr and T. M. Swager, *Chem. Mater.*, 2011, **23**, 646–657.
182. C. Journet, W. K. Maser, P. Bernier, A. Loiseau, M. L. de la Chapelle, S. Lefrant, P. Deniard, R. Lee, and J. E. Fischer, *Nature*, 1997, **388**, 756–758.
183. A. Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y. H. Lee, S. G. Kim, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, G. E. Scuseria, D. Tománek, J. E. Fischer, and R. E. Smalley, *Science*, 1996, **273**, 483–487.
184. E. Flahaut, C. Laurent, and A. Peigney, *Carbon*, 2005, **43**, 375–383.
185. M. Valcárcel, S. Cárdenas, and B. M. Simonet, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 4788–4797.
186. K. D. Ausman, R. Piner, O. Lourie, R. S. Ruoff, and M. Korobov, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 8911–8915.
187. L. Vaisman, H. D. Wagner, and G. Marom, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2006, **128–130**, 37–46.
188. P. X. Hou, S. Bai, Q. H. Yang, C. Liu, and H. M. Cheng, *Carbon*, 2002, **40**, 81–85.
189. R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, and W. A. de Heer, *Science*, 2002, **297**, 787–792.
190. S. W. Lee, N. Yabuuchi, B. M. Gallant, S. Chen, B.-S. Kim, P. T. Hammond, and Y. Shao-Horn, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **5**, 531–537.
191. R. Signorelli, D. C. Ku, J. G. Kassakian, and J. E. Schindall, *Proc. IEEE*, 2009, **97**, 1837–1847.
192. J. J. Gooding, *Electrochimica Acta*, 2005, **50**, 3049–3060.
193. M. Trojanowicz, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 480–489.
194. L. Hu, D. S. Hecht, and G. Grüner, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 5790–5844.
195. O. Matarredona, H. Rhoads, Z. Li, J. H. Harwell, L. Balzano, and D. E. Resasco, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 13357–13367.
196. A. Star, J. F. Stoddart, D. Steuerman, M. Diehl, A. Boukai, E. W. Wong, X. Yang, S.-W. Chung, H. Choi, and J. R. Heath, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 1721–1725.

197. Z. Wu, Z. Chen, X. Du, J. M. Logan, J. Sippel, M. Nikolou, K. Kamaras, J. R. Reynolds, D. B. Tanner, A. F. Hebard, and A. G. Rinzler, *Science*, 2004, **305**, 1273–1276.
198. M. Zhang, S. Fang, A. A. Zakhidov, S. B. Lee, A. E. Aliev, C. D. Williams, K. R. Atkinson, and R. H. Baughman, *Science*, 2005, **309**, 1215–1219.
199. K. Fuchsberger, A. L. Goff, L. Gambazzi, F. M. Toma, A. Goldoni, M. Giugliano, M. Stelzle, and M. Prato, *Small*, 2011, **7**, 524–530.
200. D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco, and M. Prato, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 1105–1136.
201. N. Karousis, N. Tagmatarchis, and D. Tasis, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 5366–5397.
202. P. Singh, S. Campidelli, S. Giordani, D. Bonifazi, A. Bianco, and M. Prato, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2214–2230.
203. Y. Xing, L. Li, C. C. Chusuei, and R. V. Hull, *Langmuir*, 2005, **21**, 4185–4190.
204. C.-H. Andersson and H. Grennberg, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, **2009**, 4421–4428.
205. D. Srivastava, D. W. Brenner, J. D. Schall, K. D. Ausman, M. Yu, and R. S. Ruoff, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 4330–4337.
206. J. Chen, M. A. Hamon, H. Hu, Y. Chen, A. M. Rao, P. C. Eklund, and R. C. Haddon, *Science*, 1998, **282**, 95–98.
207. M. Holzinger, O. Vostrowsky, A. Hirsch, F. Hennrich, M. Kappes, R. Weiss, and F. Jellen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 4002–4005.
208. M. Holzinger, J. Abraham, P. Whelan, R. Graupner, L. Ley, F. Hennrich, M. Kappes, and A. Hirsch, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8566–8580.
209. N. Tagmatarchis and M. Prato, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 437–439.
210. J. L. Delgado, P. de la Cruz, F. Langa, A. Urbina, J. Casado, and J. T. L. Navarrete, *Chem. Commun.*, 2004, 1734–1735.
211. K. S. Coleman, S. R. Bailey, S. Fogden, and M. L. H. Green, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8722–8723.
212. F. G. Brunetti, M. A. Herrero, J. de M. Muñoz, S. Giordani, A. Díaz-Ortiz, S. Filippone, G. Ruaro, M. Meneghetti, M. Prato, and E. Vázquez, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 14580–14581.
213. M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, and J. M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 5883–5884.
214. P. Allongue, M. Delamar, B. Desbat, O. Fagebaume, R. Hitmi, J. Pinson, and J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 201–207.
215. J. L. Bahr, J. Yang, D. V. Kosynkin, M. J. Bronikowski, R. E. Smalley, and J. M. Tour, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 6536–6542.
216. Y.-L. Zhao and J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 1161–1171.
217. R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, and H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 3838–3839.
218. D. M. Guldi, G. M. A. Rahman, F. Zerbetto, and M. Prato, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 871–878.
219. R. P. Ramasamy, H. R. Luckarift, D. M. Ivnitski, P. B. Atanassov, and G. R. Johnson, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6045.
220. A. L. Goff, F. Moggia, N. Debou, P. Jegou, V. Artero, M. Fontecave, B. Jousset, and S. Palacin, *J. Electroanal. Chem.*, 2010, **641**, 57–63.
221. Y.-L. Zhao, L. Hu, J. F. Stoddart, and G. Grüner, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 1910–1915.
222. R. Haddad, M. Holzinger, R. Villalonga, A. Neumann, J. Roots, A. Maaref, and S. Cosnier, *Carbon*, 2011, **49**, 2571–2578.

223. P. D. Tran, A. Le Goff, J. Heidkamp, B. Joussetme, N. Guillet, S. Palacin, H. Dau, M. Fontecave, and V. Artero, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 1371–1374.
224. J. Kim, H. Jia, and P. Wang, *Biotechnol. Adv.*, 2006, **24**, 296–308.
225. W. Feng and P. Ji, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 889–895.
226. S. D. Minter, P. Atanassov, H. R. Luckarift, and G. R. Johnson, *Mater. Today*, 2012, **15**, 166–173.
227. Y. Umasankar, D. B. Brooks, B. Brown, Z. Zhou, and R. P. Ramasamy, *Adv. Energy Mater.*, 2014, **4**, n/a–n/a.
228. Y. Yan, W. Zheng, L. Su, and L. Mao, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 2639–2643.
229. F. Gao, Y. Yan, L. Su, L. Wang, and L. Mao, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 989–996.
230. Y. Liu and S. Dong, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 1423–1427.
231. Y. Liu and S. Dong, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **23**, 593–597.
232. J. Lim, P. Malati, F. Bonet, and B. Dunn, *J. Electrochem. Soc.*, 2007, **154**, A140–A145.
233. Y.-M. Yan, O. Yehezkeli, and I. Willner, *Chem. – Eur. J.*, 2007, **13**, 10168–10175.
234. L. Deng, L. Shang, Y. Wang, T. Wang, H. Chen, and S. Dong, *Electrochem. Commun.*, 2008, **10**, 1012–1015.
235. J. Y. Lee, H. Y. Shin, S. W. Kang, C. Park, and S. W. Kim, *J. Power Sources*, 2010, **195**, 750–755.
236. F. S. Saleh, L. Mao, and T. Ohsaka, *Sens. Actuators B Chem.*, 2011, **152**, 130–135.
237. M. T. Meredith, F. Giroud, and S. D. Minter, *Electrochimica Acta*, 2012, **72**, 207–214.
238. M. Minson, M. T. Meredith, A. Shrier, F. Giroud, D. Hickey, D. T. Glatzhofer, and S. D. Minter, *J. Electrochem. Soc.*, 2012, **159**, G166–G170.
239. D. MacAodha, P. Ó. Conghaile, B. Egan, P. Kavanagh, and D. Leech, *ChemPhysChem*, 2013, **14**, 2302–2307.
240. D. Fapyane, S.-J. Lee, S.-H. Kang, D.-H. Lim, K.-K. Cho, T. Nam, J.-P. Ahn, J.-H. Ahn, S.-W. Kim, and I. S. Chang, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 9508–9512.
241. V. Scherbahn, M. T. Putze, B. Dietzel, T. Heinlein, J. J. Schneider, and F. Lisdat, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **61**, 631–638.
242. K. P. Prasad, Y. Chen, and P. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 3387–3393.
243. C. H. Kwon, S.-H. Lee, Y.-B. Choi, J. A. Lee, S. H. Kim, H.-H. Kim, G. M. Spinks, G. G. Wallace, M. D. Lima, M. E. Kozlov, R. H. Baughman, and S. J. Kim, *Nat. Commun.*, 2014, **5**.
244. U. Schröder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 7370–7372.
245. E. Katz and K. MacVittie, *Energy Environ. Sci.*, 2013, **6**, 2791–2803.
246. R. F. Drake, B. K. Kusserow, S. Messinger, and S. Matsuda, *ASAIO J.*, 1970, **16**, 199–205.
247. M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 179–190.
248. T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, and M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 5129–5134.
249. T. Miyake, K. Haneda, N. Nagai, Y. Yatagawa, H. Onami, S. Yoshino, T. Abe, and M. Nishizawa, *Energy Environ. Sci.*, 2011, **4**, 5008–5012.
250. P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, and S. Cosnier, *PLoS ONE*, 2010, **5**, e10476.

251. M. Rasmussen, R. E. Ritzmann, I. Lee, A. J. Pollack, and D. Scherson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 1458–1460.
252. L. Halámková, J. Halámek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, and E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 5040–5043.
253. A. Szczupak, J. Halámek, L. Halámková, V. Bocharova, L. Alfonta, and E. Katz, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **5**, 8891–8895.
254. K. MacVittie, J. Halámek, L. Halámková, M. Southcott, W. D. Jemison, R. Lobel, and E. Katz, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **6**, 81–86.
255. J. A. Castorena-Gonzalez, C. Foote, K. MacVittie, J. Halámek, L. Halámková, L. A. Martinez-Lemus, and E. Katz, *Electroanalysis*, 2013, **25**, 1579–1584.



# II. Macroélectrodes nanostructurées de CNTs : conception de nouvelles bioélectrodes pour les biopiles glucose-O<sub>2</sub> implantables

II. Macroélectrodes nanostructurées de CNTs : conception de nouvelles bioélectrodes pour les biopiles glucose-O <sub>2</sub> implantables.....	71
II.1 Introduction .....	73
II.2 Bioanode nanostructurée à base de GOx par transfert électronique indirect.....	76
II.2.1 Incorporation d'un médiateur rédox « insoluble » : 1,4-Naphtoquinone .....	76
II.2.2 Etudes de différentes membranes pour l'optimisation de la diffusion au sein de la matrice 3D .....	79
II.2.3 Effet de la quantité de NQ sur la catalyse .....	83
II.2.4 Autres médiateurs de types « quinone ».....	86
II.3 Cathodes 3D à bases d'enzymes à cuivre .....	91
II.3.1 Réduction de O <sub>2</sub> par les MCOs .....	91
II.3.2 Cathode MWCNTs/Laccase en transfert direct .....	93
II.3.3 Cathode MWCNTs/Tyrosinase en transfert direct.....	94
II.4 Biopiles GOx-NQ / Lac ; GOx-NQ/PPO .....	98
II.4.1 Performances des biopiles GOx-NQ/Laccase et GOx-NQ/PPO.....	99
II.4.2 Stabilité en fonctionnement et stockage de la biopile GOx-NQ/Lac .....	101
II.4.3 Alimentation d'une DEL avec une biopile GOx-NQ/Lac.....	105
II.5 Conclusions .....	106





## II.1 Introduction

Un grand nombre de travaux récents se sont focalisés sur l'utilisation des nanotubes de carbone (CNTs) dans la conception de biopile. Comme décrites dans le chapitre I, ils possèdent une combinaison de propriétés intrinsèques (grande surfaces spécifiques, transfert électronique) qui les rendent particulièrement indiqués dans la connexion enzymatique aux électrodes des biopiles<sup>1</sup>. A partir de ces CNTs, il est possible de former des architectures d'électrodes particulièrement intéressantes pour les biopiles enzymatiques. Ces dernières ont pour but d'accroître les performances des PACE à glucose en optimisant les transferts électroniques protéine-électrode, étendre les surfaces électro-actives tout en limitant la taille du dispositif et en facilitant la diffusion des substrats jusqu'au biocatalyseur.

Récemment, un certain nombre d'études ont par exemple montré l'intérêt d'organiser ces CNTs en matrices nanostructurées ou encore de former des composites à base de CNTs, celles-ci induisant d'excellentes propriétés de transfert d'électron et d'immobilisation de protéine. Entre autre, Nishizawa et al. ont étudiés en 2011 l'utilisation de « forêt » de CNTs (CNTF) pour l'optimisation de la connexion et l'immobilisation de grande quantité d'enzyme<sup>2</sup>. Ces CNTF ont l'avantage de présenter d'importantes surfaces spécifiques ( $1300 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) et donc de permettre l'immobilisation d'un grand nombre de protéines. De plus, par séchage de l'électrode de CNTF fonctionnalisée par la biomolécule, la structure a la propriété de se rétracter et donc d'induire un meilleur transfert électronique entre l'enzyme et le CNT (Figure II.1A et C). Ce même groupe a récemment publié une étude dans laquelle ils utilisent ce même concept de CNTF dans le but d'élaborer une biopile glucose- $\text{O}_2$  à base de glucose oxydase (GOx) et d'un polymère d'osmium comme médiateur redox<sup>3</sup>. Ces électrodes présentent la particularité d'être facilement manipulables due à leur stabilité mécanique.

Dans l'idée de synthétiser des matériaux d'électrode suffisamment stables pour leur utilisation dans les biopiles enzymatiques, les « bucky papers » de CNTs, se présentant sous la forme d'une feuille de CNTs plus ou moins flexible, sont aussi envisagés<sup>4</sup>. Outre les propriétés mécaniques du matériau en lui-même, des résultats récents ont démontré leur intérêt dans la conception de bioélectrodes enzymatiques puissantes et stables<sup>5</sup>. Ce type d'architecture a déjà pu être utilisé pour la conception de biopiles pour l'implantable<sup>6</sup>.

Outre l'organisation ou la structuration des CNTs, la conception de composites incorporant des CNTs et un polymère électrogénéré a également été abondamment utilisée pour l'élaboration de bioélectrodes (Figure II.1B et D). Par exemple en 2010, Gao et al. ont également décrit la formation de « fils » de CNTs par agrégation de CNTs autour d'un polymère de polyvinyl alcool (PVA). Grâce à la formation de ces fibres de CNTs hautement poreuses, les surfaces spécifiques obtenues étaient de l'ordre de  $300 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ . Ces électrodes nanostructurées ont permis l'élaboration d'une biopiles glucose- $\text{O}_2$  puissante<sup>7</sup>.

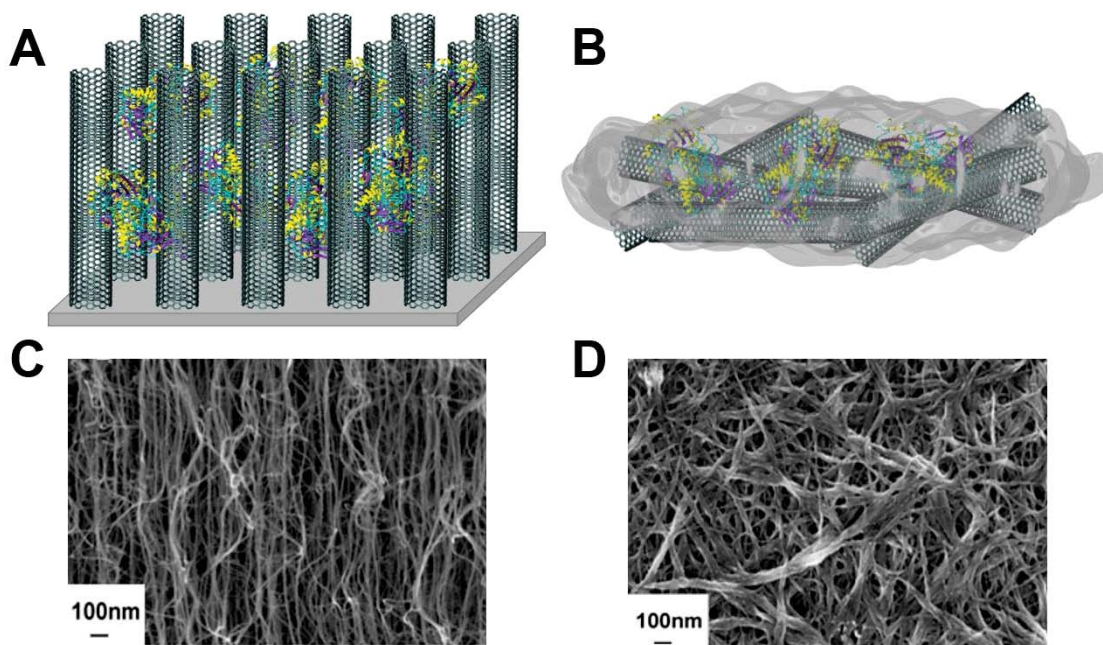


Figure II.1 : Schémas représentatifs de deux types d'architectures à base de CNTs et d'enzyme A) bioélectrode enzymatique de forêt de nanotube B) composite enzyme/polymère/CNTs et clichés MEB de C) d'une forêt de CNTs D) de CNTs recouvert par un polymère électrogénéré

Au laboratoire, une alternative à ces technologies a été développée. Celle-ci s'appuie sur le confinement d'enzymes rédox au sein de matrice de CNTs par simple compression mécanique donnant accès à une électrode nano-structurée cylindrique mécaniquement très stable et aisément manipulable en vue d'implantations chez l'animal.

Les premiers travaux avaient été réalisés en utilisant du graphite comme matrice conductrice. Le graphite n'étant pas un matériau de choix pour obtenir du DET à partir d'enzyme rédox, le choix d'utiliser des intermédiaires de transport d'électrons (médiaeurs) ont alors été envisagé. L'utilisation de glucose oxydase (GOx) à l'anode et de tyrosinase (polyphénol oxydase ou PPO) connectées respectivement par la phénanthrène quinone (PQ) et le tetrathiafulvalène (TTF) en tant que médiateur rédox ont permis l'obtention de puissances de l'ordre de  $40 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$  avec une force électromotrice (f.e.m) de 0,32 V tout en conservant une stabilité en OCV et en puissance délivrée pendant 25 jours<sup>8</sup>. Une biopile basée sur le même principe, mais avec des médiateurs différents, a également pu être implantée avec succès dans un rat. La puissance obtenue à l'intérieur de l'animal ( $5,75 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) a permis de confirmer le fonctionnement du dispositif implanté<sup>9</sup>. Cependant, les puissances et les f.e.m de ces biopiles n'ont pas permis d'envisager de réelles applications pour ces bioélectrodes.

A partir de ces résultats préliminaires obtenu avec du graphite, l'utilisation de matrice de CNTs dans les mêmes configurations a permis d'accroître les performances de la biopile de manière significative. Les propriétés de transfert d'électron des CNTs ont donné l'opportunité de s'affranchir des médiateurs rédox et donc d'augmenter la f.e.m de la pile grâce au transfert direct d'électron entre la protéine et l'électrode. Les surfaces spécifiques de l'ordre de  $280 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

<sup>1</sup> rendent également possible le confinement d'un grand nombre de protéines au sein de la matrice de CNTs, se présentant sous forme d'un disque composite CNTs/enzyme (Figure II.2 A). Par utilisation de la GOx à l'anode pour l'oxydation du glucose et de la laccase à la cathode pour la réduction de l'oxygène, la biopile nanostructurée a permis l'obtention d'excellentes performances avec un transfert électronique directe aux deux bio-électrodes<sup>10</sup>. Ce même dispositif miniaturisé a, par la suite, pu être implanté dans un rat<sup>11</sup>. A l'intérieur de l'animal, les puissances de la pile ont atteint  $193,5 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$  et aucun signe de rejet des bioélectrodes par le rat n'a été visible durant 110 jours après l'implantation, soulignant la bonne biocompatibilité du système. Ce dispositif implanté dans le mammifère a notamment permis l'alimentation d'une diode ainsi qu'un thermomètre électronique grâce à la consommation du glucose et de l'oxygène par les enzymes connectées (Figure II.2 B).

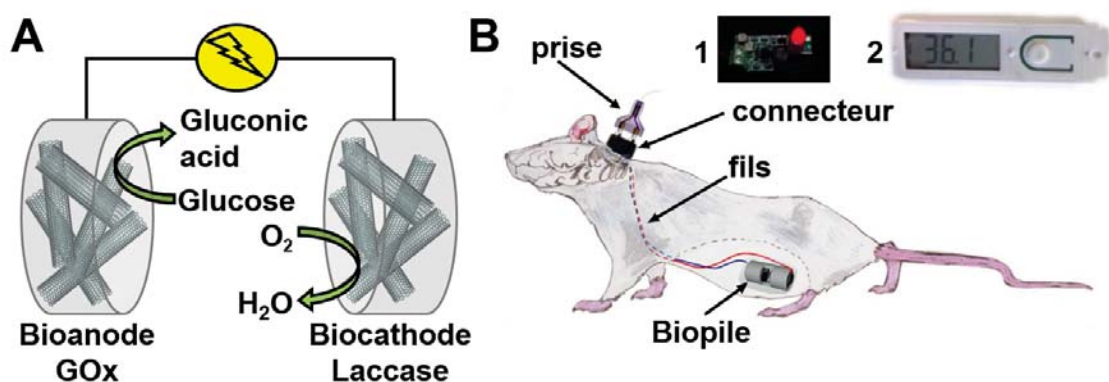


Figure II.2: A) schéma représentatif de la biopile GOx/Lac dans la nanostructure de CNTs B) schéma de la biopile implantée dans l'abdomen d'un rat pour l'alimentation d'une diode et d'un thermomètre électronique

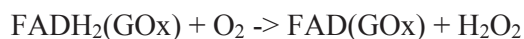
Cependant, si le transfert électronique entre la laccase (Lac), et plus généralement les enzymes à cuivre<sup>12</sup>, et les CNTs est efficace et largement utilisé, la collecte des électrons de la GOx est beaucoup plus délicate notamment en raison d'un encombrement stérique important (protéine glycosylée), de la profondeur du site actif au sein de l'enveloppe protéique et de la réactivité du cofacteur sous forme réduite vis-à-vis de l'oxygène. En effet, l'existence d'un véritable transfert direct entre la FAD de la GOx et l'électrode fait débat et il apparaît souvent difficile à déterminer<sup>13</sup>. C'est particulièrement vrai dans le cas des matrices de CNTs qui font intervenir un très grand nombre d'enzymes, ou la possibilité d'un transfert d'électron indirect *via* des enzymes dénaturées ou des FAD libres n'est pas à écarter. Pour toutes ces raisons nos expériences se sont focalisées sur l'optimisation de la connexion de la GOx par introduction de médiateurs rédox pour la bio-anode. A la biocathode, différentes enzymes à cuivre ont été connectées directement sur les matrices nanostructurées de MWCNTs. Nous avons ainsi étudié la connexion de différents types d'enzymes dans ces matrices de CNTs et développés de nouvelles biopiles, en particulier pour avoir accès à des stabilités et des puissances importantes dans l'optique de leur implantation chez l'animal pour l'éventuelle alimentation de dispositifs à faible demande énergétique.

## II.2 Bioanode nanostructurée à base de GOx par transfert électronique indirect

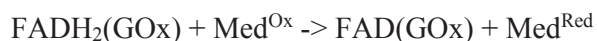
### II.2.1 Incorporation d'un médiateur rédox « insoluble » : 1,4-Naphtoquinone

Le principe de la médiation de la GOx s'appuie sur la substitution de O<sub>2</sub>, substrat naturel de régénération du cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide (FAD), par une espèce rédox active qui sera ensuite ré-oxydée à la surface de l'électrode.

En effet, lors de l'oxydation du glucose, la FAD est réduite en FADH<sub>2</sub> qui est alors naturellement oxydé par le dioxygène :

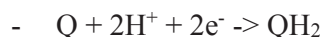


Pour le cas où la connexion de la GOx est obtenue par le biais d'un médiateur



Depuis de nombreuses années l'utilisation de ces molécules relais, en solution ou immobilisées, a permis de contourner la difficulté que représente la connexion directe de la GOx. Les structures de ces relais électroniques sont diverses, allant des complexes de coordination à des médiateurs purement organiques<sup>14</sup>. Les structures chimiques de ces médiateurs vont avoir une influence sur les propriétés de connexion. Le potentiel électrochimique de l'espèce rédox va avoir un rôle prépondérant dans la qualité du transfert d'électron entre le cofacteur réduit et le médiateur<sup>15</sup>. De même, l'encombrement stérique de la sonde est un autre paramètre de taille puisque celle-ci doit accéder au site actif de la GOx<sup>16,17</sup>.

Parmi les espèces organiques, les quinones représentent une classe de molécules rédox particulièrement utilisée dans les processus de transfert électronique enzyme-électrode. Leur processus d'oxydo-réduction met en jeu 2 H<sup>+</sup> et 2 e<sup>-</sup> :



En particulier, la 1,4-Naphtoquinone (NQ), une *p*-quinone possédant un potentiel rédox de E<sub>1/2</sub> = -0,17V vs SCE à pH 7, présente une structure tout à fait intéressante. Son potentiel, supérieur à celui du couple FAD/FADH<sub>2</sub> de presque 300 mV est idéalement situé pour permettre un excellent transfert électronique tout en conservant une f.e.m importante lors de son utilisation dans une biopile. Elle est composée du noyau benzoquinone, responsable de son activité rédox



et un noyau aromatique. Ce dernier lui confère une très faible solubilité en milieu aqueux (90 mg.L<sup>-1</sup> dans l'eau) ainsi qu'une aromaticité importante rendant possible les interactions de «  $\pi$ -stacking » sur la paroi des CNTs. Ses propriétés rédox ainsi que sa structure en font donc un excellent candidat pour la médiation et pour son incorporation au sein de bioanodes nanostructurées à base GOx et de MWCNTs.

Le médiateur a pour but de connecter indirectement un maximum de GOx. Cependant, dans ces nanostructures, il est peu probable que la totalité des enzymes immobilisées échangent leurs électrons avec la sonde rédox. Dans ce cas précis, la FADH<sub>2</sub> formé par oxydation du glucose peut être régénéré par O<sub>2</sub>, substrat naturel de la GOx pour former du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pour limiter ce processus la catalase (Cat) est intégrée à la structure pour permettre la dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et en O<sub>2</sub>. La protéine joue un rôle doublement positif puisqu'elle élimine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé et même si il produit du dioxygène, elle n'en produit qu'une demi-mole, pour une mole utilisée lors de l'oxydation de FADH<sub>2</sub> en FAD (Figure II.3).

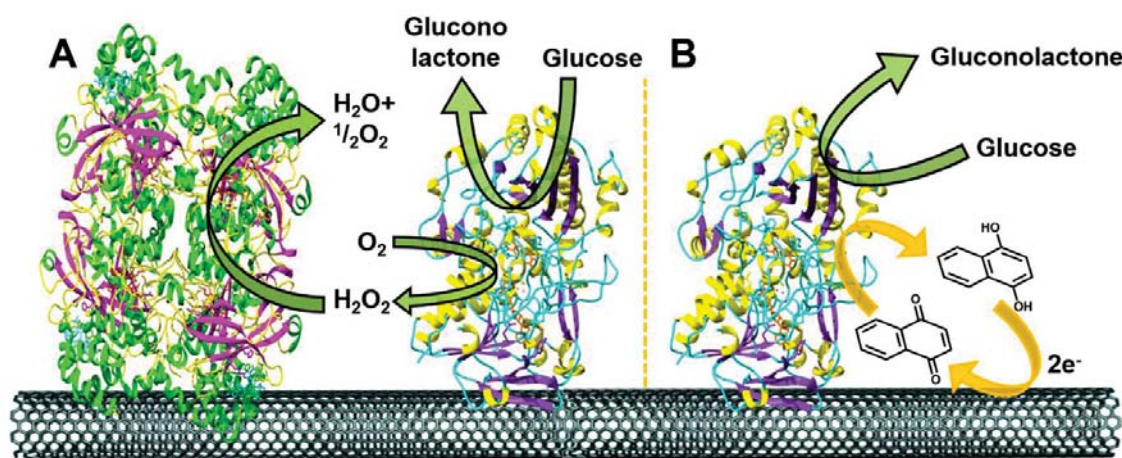


Figure II.3 : Schéma représentatif de A) dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par la GOx par la catalase B) processus de transfert électronique entre la GOx et la matrice de CNTs grâce à la 1,4-NQ en tant que médiateur rédox

L'électrode nanostructurée à base de MWCNTs par compression mécanique pour l'anode consiste en une pâte composite constituée de : GOx (35 mg), NQ (5 mg), Catalase (10 mg) et de CNTs multi parois (MWCNTs) (35mg). Une fois la pâte homogénéisée, celle-ci est compressée mécaniquement à l'aide d'une presse hydraulique pour donner un disque solide de diamètre et d'épaisseur modulable ainsi qu'aisément manipulable. Dans cette partie de l'étude, le diamètre du disque de MWCNTs est de 0,5 cm et son épaisseur de 0,5 cm.

Afin d'utiliser l'électrode nanostructurée à base de MWCNTs formée, un fil de cuivre est connecté à l'électrode via une pâte de carbone conductrice. Ce contact est ensuite isolé de la solution par du silicone. La bio-anode GOx-NQ peut alors être caractérisée par voltampérométrie cyclique (CV) (Figure II.4). Les CVs sur ce type d'électrodes sont réalisées à très faibles

vitesses de balayage,  $0,2\text{mV.s}^{-1}$ , afin de minimiser les courants capacitifs dû aux grandes quantités de CNTs utilisées lors la conception de l'électrode.

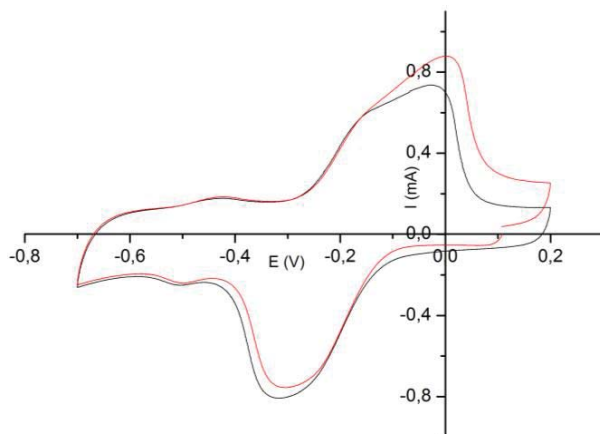


Figure II.4 : CV de la Bioanode GOx-Cat-NQ sans (courbe noire) et avec 150mM de glucose (courbe rouge) à  $37^{\circ}\text{C}$ , sous argon, TP0,2M pH7 ( $0,2\text{mV.s}^{-1}$ )

La CV en l'absence de glucose présente les systèmes rédox réversibles caractéristiques correspondants à la FAD à  $E_{1/2} = -0,46\text{V}$  et la NQ à  $E_{1/2} = -0,17\text{V}$ . Concernant le système attribué à la FAD de la GOx, le  $\Delta E$  d'une valeur de 75mV est plus proche de celui d'une espèce immobilisée que le système attribuée à la NQ pour lequel un important  $\Delta E$  est observé (300mV). L'important  $\Delta E$  observé pour la 1,4-NQ peut être expliqué par un transfert électronique entre l'espèce et l'électrode non idéal. En effet, la sonde rédox étant relativement insoluble, il est possible que la réponse électrochimique de l'espèce non solvatée en milieu aqueux, et d'autant plus dans la nanostructure, ne soit pas réellement réversible. La présence de deux systèmes de pics peut également décrire deux processus rédox successifs à un proton et un électron qui peut s'observer sur les dérivés quinone<sup>18</sup>.

En présence de glucose (150mM) et sous argon, on observe une augmentation de la valeur de courant d'oxydation au niveau des pics rédox de la 1,4-NQ. Cette vague catalytique confirme la présence d'un transfert électronique indirect entre la  $\text{FADH}_2$  de la GOx et la 1,4-NQ qui s'exprime par la présence d'un courant de catalyse d'oxydation du glucose de l'ordre de  $140\text{ }\mu\text{A}$  à 0V, au niveau de l'oxydation de  $\text{NQH}_2$  en NQ. La faible augmentation du courant au niveau du pic d'oxydation de la FAD met en évidence la faible capacité de l'enzyme à transférer ses électrons directement à l'électrode, sans passer par le médiateur rédox. En effet, on observe un possible courant catalytique négligeable de seulement  $10\text{ }\mu\text{A}$  à  $-0,40\text{V}$ . Ce faible courant souligne la difficulté de connecter la Glucose oxydase de manière directe et l'avantage relatif à l'utilisation d'un médiateur rédox à la bioanode.

De plus, dans le cas de ces électrodes nanostructurées de MWCNTs élaborées par compression mécanique, il est envisageable qu'une partie des enzymes ait été détériorée pendant le processus de fabrication de l'électrode, au moment de la compression et que le cofacteur soit en réalité à l'extérieur de l'enveloppe protéique. En effet, la difficulté d'obtenir un transfert électronique

direct entre la GOx et l'électrode lors de l'oxydation du glucose a déjà été soulignés dans le chapitre précédent<sup>13</sup>.

L'intégration de l'aire des vagues obtenues en CV a permis d'avoir accès aux quantités d'espèces, FAD-GOx et NQ, présentant une réponse électrochimique à l'intérieur de la nanostructure. La vague correspondant à la FAD indique que 91% de GOx intégrée aux CNTs répondent électrochimiquement. Ce chiffre est à relativiser puisque, comme précisé précédemment, le processus de fabrication de la bioélectrode peut possiblement altérer la structure de la protéine, la FAD visualisée en électrochimie n'est donc pas nécessairement toujours au sein de la protéine active mais éventuellement à l'extérieur de l'enveloppe protéique ou dans l'enzyme dénaturée. De plus, la protéine étant utilisée sans aucune purification la probabilité d'avoir des FAD libres n'est pas négligeable. En revanche, seulement 52% de la quantité de NQ ajouté au composite est visible en CV. Ceci peut en partie s'expliquer par l'insolubilité du composé qui, non solvato, ne présente pas de réponse redox.

## II.2.2 Etudes de différentes membranes pour l'optimisation de la diffusion au sein de la matrice 3D

L'épaisseur et la quantité de nanomatériaux utilisés pour la conception de ces bio-électrodes font d'elles de très bonnes candidates pour l'implantation puisqu'elles possèdent de très grande surfaces électro-actives dans un volume limité. Pour tirer avantage de toutes ces propriétés, le transport de matière, plus précisément en substrat, au sein de l'électrode doit être optimisé. Compte tenu de la porosité des électrodes réalisées, pouvant permettre la diffusion des enzymes en solution, et afin de stabiliser mécaniquement la surface de ces bioélectrodes nous nous sommes intéressés à l'utilisation de membranes perméables au substrat pour recouvrir ces dernières.

Pour cela, trois type de « membranes » utilisées dans les applications de piles à combustible ou en bioélectrochimie pour l'encapsulation de protéine ont été étudiées (Figure II.5):

- Membrane cellulosique « papier filtre » (Figure II.5 A)
- Membrane Nafion 117 (Figure II.5 B)
- Membrane polypyrrolique/PolyStyrène Sulfonate (PPy/PSS) (Figure II.5 C)



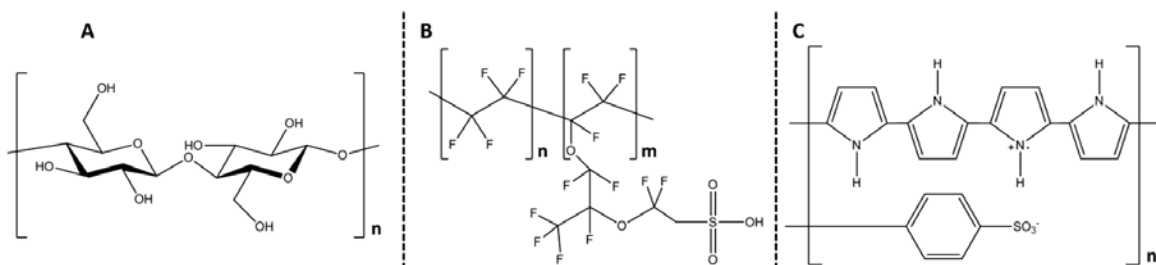


Figure II.5: (A) Structure simplifiée de la cellulose (B) Structure simplifiée du Nafion 117 (C) Structure simplifiée du PPy/PSS électrogénéré

Les membranes ont été déposées par différents procédés. La cellulose, sous forme de « feuille », est collée sur la surface lors de l'isolation de l'électrode connectée avec le silicium, le Nafion 117 est déposé puis séché et enfin le PPy/PSS est déposé sous forme de solution puis électropolymérisé en solution à la surface de l'électrode.

La présence d'une forte contribution capacitive (même à faible vitesse de balayage) ne permet pas d'évaluer pleinement les propriétés catalytiques de la bio-électrodes vis-à-vis du glucose par CV. Pour évaluer ces propriétés, des mesures de chronoampérométries ont été réalisées sur les bio-électrodes en suivant la réponse en courant d'oxydation en fonction de l'addition de concentrations croissantes de glucose en fixant le potentiel à 0,3 V Vs ECS (Figure II.6 A).

Les mesures chronoampérométriques ont permis de caractériser l'activité catalytique des bio-anodes GOx-NQ pour chaque type de membranes utilisé. Les décharges sont effectuées à 0,3V.

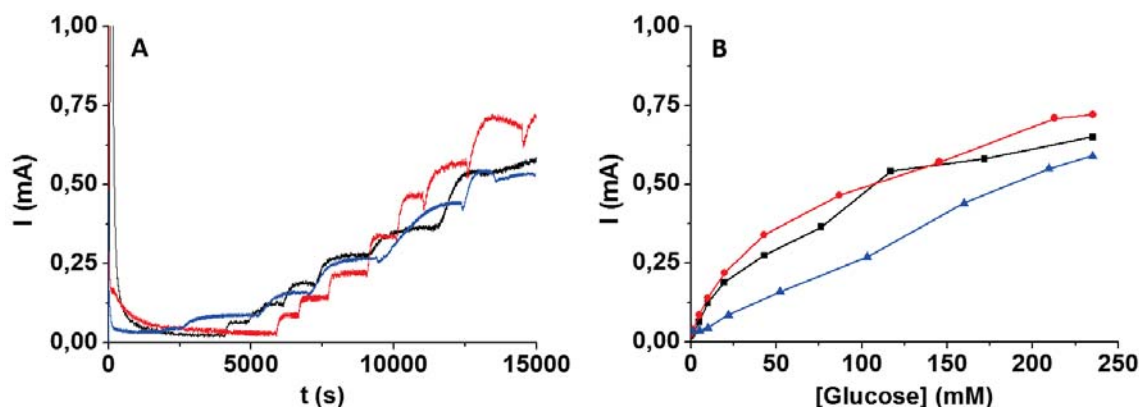


Figure II.6 : (A) Mesures de chronoampérométrie à 0,3 V Vs SCE des bio-anodes avec membranes de cellulose (courbe bleue), de Nafion 117 (courbe rouge) et de PPy-PSS (courbe noire) suivant des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans TP 0,2M pH7, 37°C (B) Courbes d'étalonnage obtenues à partir des mesures de chronoampérométrie à 0,3 V Vs SCE suivant l'addition de glucose pour les bio-électrodes à membrane de cellulose (courbe bleue), Nafion 117 (courbe rouge) et PPy-PSS (courbe noire) dans TP 0,2M pH7, 37°C

Ces expériences à potentiel imposé donne une indication sur le temps de réponse de la catalyse qui suit l'addition de substrat qui peut directement être reliée à la diffusion de ce dernier jusqu'à la protéine au sein de la bio-électrode. Les différentes membranes donnent des résultats significativement différents en termes de réponse anodique (Figure II.6 A). Dans le cas de la membrane de cellulose, les courants catalytiques observés à plus basses concentrations sont

beaucoup moins important en comparaison avec les autres électrodes. Notamment, à 5 mM de glucose, le courant catalytique délivré par la bio-électrode à membrane cellulosique est seulement de 36  $\mu\text{A}$  alors que les anodes PPy/PSS et Nafion117 donnent respectivement 65 et 80  $\mu\text{A}$ . La courbe d'ajout pour cette bio-anode présente aussi un temps de réponse à l'ajout de glucose supérieur aux deux autres types d'électrodes et qui est de l'ordre de plusieurs minutes avant la stabilisation du signal. Cette différence de comportement se retrouve également sur la courbe d'étalonnage présentant l'intensité du courant anodique obtenu en fonction de la concentration de glucose dans le milieu (Figure II.6 B). L'allure de ces courbes peut être expliquée par la cinétique enzymatique de la GOx dans l'électrode recouverte par une membrane.

En effet, dans le cas d'une enzyme en solution, la vitesse de la cinétique enzymatique est modélisée par l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Avec V correspondant à la vitesse initiale,  $V_{MAX}$  la vitesse maximum à laquelle l'enzyme est saturée en substrat,  $K_M$  la constante de Michaelis-Menten et [S] la concentration en substrat.

Lorsqu'une membrane est ajoutée à une électrode, comme tel est le cas dans cette série d'expériences sur différents types de membranes, le modèle de Michaelis-Menten peut alors être modifié afin de tenir compte des phénomènes de diffusion des espèces (substrat) dans la membrane<sup>19</sup>. L'équation devient alors :

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + V_{MAX} \frac{d}{D} + [S]}$$

Avec d l'épaisseur de la membrane ayant un impact sur la diffusion du substrat et D le coefficient de diffusion du substrat à travers la membrane. Ces deux modèles peuvent être comparés dans deux configurations différentes :

- A forte concentration en substrat [S], permettant de saturer la totalité des enzymes, la valeur de  $V_{MAX}$  obtenue dans les deux équations sera identique puisque dans le modèle classique  $K_M$  devient négligeable devant [S] et dans le cas de l'équation arrangée pour la présence d'une membrane limitant la diffusion, le terme  $K_M + V_{MAX}(d/D)$  devient lui aussi négligeable devant [S].

- Dans le cas d'une faible concentration en substrat  $[S]$ , dans le premier cas,  $[S]$  devient alors négligeable et donne une pente égale à  $V_{MAX}/K_M$ . Dans le second cas, la pente devient alors égale à  $V_{MAX}/(K_M + V_{MAX}(d/D))$ .

Aussi, lorsque la concentration en substrat correspond à  $V = V_{MAX}/2$  (à  $[S]_{1/2}$ ), on obtient dans le cas d'une diffusion non limitante  $[S]_{1/2} = K_M$ . Dans le cas d'une diffusion limitée par une membrane, on obtient  $[S]_{1/2} = K_M + V_{MAX}(d/D)$ .

Il est donc possible de tracer une représentation graphique de l'évolution de  $V$  en fonction de la concentration en substrat pour le modèle d'une enzyme en solution, sans limite de diffusion de substrat, et pour le modèle prenant en compte une limite de diffusion en substrat induite par une membrane (Figure II.7).

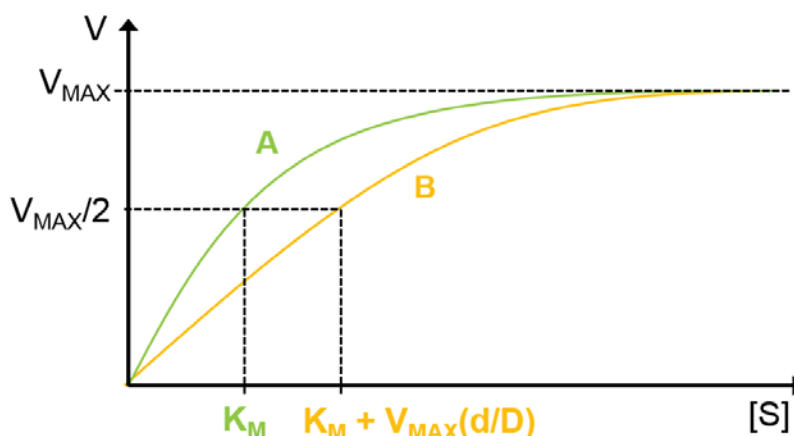


Figure II.7 : représentation graphique des lois de vitesse pour A) le modèle Michaelis-Menten pour une enzyme en solution sans contrainte de diffusion B) modèle de Michaelis-Menten modifié incluant les contraintes de diffusion de substrat à travers une membrane

Dans le cas de la biocanode, le courant catalytique  $I$  enregistré est assimilée à la vitesse de la cinétique enzymatique  $V$ . Les courbes d'étalonnage obtenues pour l'ajout de concentration croissantes de glucose sur les anodes nanostructurées s'apparente donc bien à un modèle caractérisant l'évolution du courant catalytique ralenti par la limitation de diffusion du glucose à travers les différents types de membrane.

Dans le cas de l'anode à membrane de cellulose, cette évolution est quasi linéaire. De celle-ci, il est possible de déduire graphiquement la valeur de  $K_m^{app}$  (constante de Michaelis apparente) de l'ordre de 130 mM, bien supérieure au  $K_m$  théorique relevé pour la GOx en solution soit 30 mM à 25 °C<sup>20</sup>. Dans le cas des deux autres membranes, la courbe  $I=f([Glu])$  s'apparente, dans la forme, à des cinétiques enzymatique plus proches de celles observées en solution. Graphiquement, pour les deux types de membrane les valeurs de  $K_m^{app}$  relevées sont de l'ordre de 60 mM, ce qui se rapproche sensiblement de la valeur théorique citée mais démontrant tout de même une limitation par la diffusion.

Tous ces éléments attestent d'une diffusion lente du substrat à travers le film de cellulose déposé et donc vers la protéine et son site actif. La concentration réelle en substrat à l'intérieur de la matrice 3D est donc bien inférieure à la concentration ajoutée dans le milieu. En revanche le courant maximum de catalyse  $I_{\max(\text{Cellulose})} = 590 \mu\text{A}$ , obtenu à concentration saturante en substrat, se rapproche des valeurs obtenus avec les deux autres membranes PPy/PSS et Nafion 117, où les courants de catalyse observés sont respectivement  $I_{\max(\text{PPy/PSS})} = 650 \mu\text{A}$  et  $I_{\max(\text{Nafion 117})} = 710 \mu\text{A}$ , ce qui est tout à fait cohérent sachant que  $I_{\max}$  ne dépend que de la quantité d'enzyme active immobilisée.

Dans l'optique de travailler dans des conditions se rapprochant le plus possible de celles retrouvées dans le milieu physiologique, l'activité catalytique de la bioanode à 5 mM de glucose est un paramètre essentiel. De ce fait, la diffusion du substrat a un caractère prépondérant au bon fonctionnement de la bioanode en conditions d'implantation. Les deux membranes PPy/PSS et Nafion 117 répondent toutes deux à cet impératif.

La bonne catalyse d'oxydation du glucose obtenu par ces deux types de bio-anodes en font d'excellentes candidates pour l'alimentation de dispositifs implantables. Cependant, afin de disposer d'une pile biocompatible, un autre paramètre essentiel doit être étudié, à savoir la capacité de rétention de ces dernières vis-à-vis de la NQ. En effet, la NQ et sa forme réduite possède une très faible solubilité en milieu aqueux. La NQ possède une bande d'absorption à 345 nm dans l'eau, il est donc possible de quantifier la perte de médiateur rédox à l'extérieur de la bioélectrode, dû à son éventuelle solubilisation au cours du temps.

Les mesures ont été effectuées pendant plusieurs jours après l'exposition de la bioanode à de fortes concentrations de glucose (200 mM) et à 37°C. Pour les deux types de membranes PPy/PSS et Nafion 117, la perte du médiateur s'effectue principalement lors des deux premiers jours avec en moyenne 20% de l'espèce solubilisé au bout de 48h d'incubation en milieu saturé et à 37 °C. Cette valeur se stabilise autour de 25% après 8 jours d'incubations pour les deux types de membrane. Ces résultats sont positifs en termes de rétention de l'espèce rédox puisque, pour comparaison, les mesures effectuées sur une bioanode à membrane de cellulose montrent une perte de 78% du médiateur en l'espace de deux jours.

### II.2.3 Effet de la quantité de NQ sur la catalyse

Dans une autre série d'expérience, la relation entre le ratio médiateur/enzyme intégré à la bioélectrode et la catalyse d'oxydation du glucose a été étudiée (Figure II.8). Cette étude s'est focalisée uniquement sur la membrane PPy/PSS décrite auparavant. Cette membrane a été choisie puisqu'elle fait partie des deux meilleures dans l'étude précédente. De plus elle est facile à réaliser.

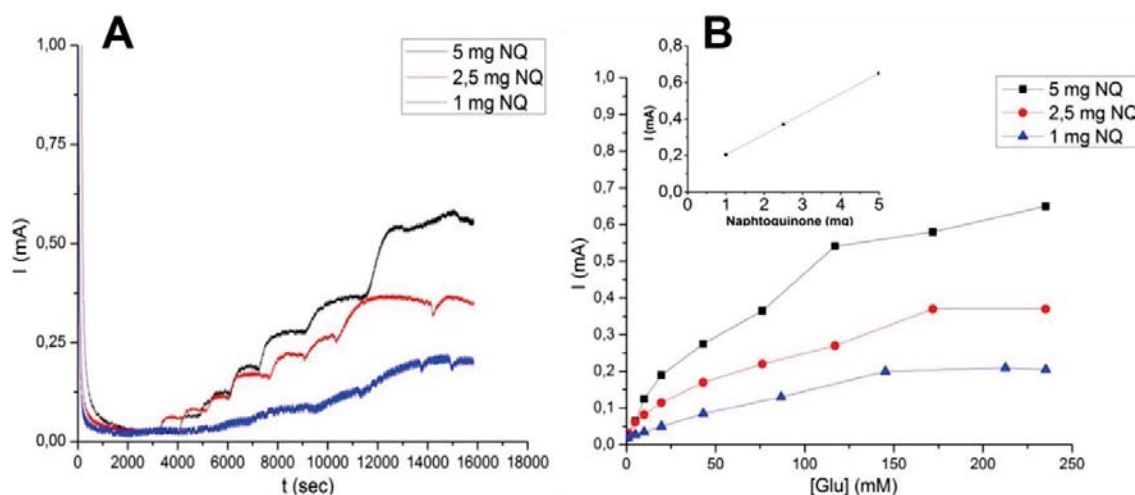


Figure II.8 : (A) Mesures de chronoampérométrie à 0,3 V Vs SCE des bio-anodes à membrane PPy-PSS contenant 1 mg (courbe bleue), 2,5 mg (courbe rouge) et 5 mg (courbe noire) de 1,4-NQ ainsi que 15 mg de GOx en fonction des ajouts de concentrations croissantes en glucose dans TP 0,2M pH7, 37°C (B) Courbes d'étalonnage obtenues à partir des mesures de chronoampérométrie à 0,3 V Vs SCE suivant l'addition de glucose pour les bio-électrodes à membrane PPy-PSS contenant 1 mg (courbe bleue), 2,5 mg (courbe rouge) et 5 mg (courbe noire) de 1,4-NQ ainsi que 15 mg de GOx dans TP 0,2M pH7, 37°C

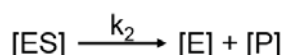
Pour trois ratios 1,4-NQ/GOx de 1/15 ; 2,5/15 et 5/15 (en mg), des mesures de chronoampérométrie à 0,3 V Vs SCE ont été réalisées pour suivre l'évolution du courant catalytique de la bio-anode en ajoutant des concentrations croissantes de glucose.

Pour chaque ratio, le courant d'oxydation augmente consécutivement à l'ajout de glucose (Figure II.8 A). L'apparition du courant catalytique est suivie d'une stabilisation plutôt lente lorsque la quantité de médiateur est moindre. A l'inverse, elle semble être rapide pour le ratio présentant la plus grande quantité de médiateur. De même, le  $I_{\max}$  obtenu à concentration saturante en substrat est croissant du ratio 1/15 ; 2,5/15 et 5/15 avec respectivement  $I_{\max(1/15)} = 205 \mu A$  ;  $I_{\max(2,5/15)} = 370 \mu A$  et  $I_{\max(5/15)} = 650 \mu A$ . La Figure II.8B montre l'évolution du courant catalytique obtenu en fonction de la concentration en glucose ajoutée. Pour les trois ratios, les formes des courbes sont similaires. Les courbes s'apparentent à des cinétiques enzymatiques et, graphiquement, il est possible de retrouver des valeurs de  $K_m^{app}$  très proches pour les trois ratios, de l'ordre de 60 mM. En changeant les quantités de médiateur à l'intérieur de la bioélectrode nanostructurée, on ne change pas les propriétés de diffusion de la membrane. Le  $I_{\max}$  obtenu est en revanche proportionnel à la quantité de médiateur et augmente de manière quasi linéaire avec la quantité de NQ (Figure II.8 B insert). Ceci peut s'expliquer, par la probabilité plus importante pour la GOx d'interagir avec un médiateur dans le cas d'une quantité importante en médiateur. Dans le cas de cette expérience, le  $V_{MAX}$  est reliée à la quantité d'enzymes connectées et donc actives dans le processus électrocatalytique. Plus la quantité de médiateur est grande, plus la quantité d'enzymes connectée est élevée. Donc, une quantité plus importante de médiateur facilite la connexion électrique d'un plus grand nombre d'enzymes au sein de la matrice 3D et permet donc l'obtention de courants catalytiques plus

importants. Cependant, le calcul des ratios médiateur/enzyme en mole (68/1 pour 1 mg de 1,4-NQ, 169/1 pour 2,5 mg et 338/1 pour 5 mg) permet de s'apercevoir que dans chaque cas l'excès de médiateur par rapport à la protéine est très important. Ceci souligne une capacité d'interaction limitée entre la 1,4-NQ et la GOx qui peut être attribuée à la faible solubilité du médiateur. Malgré cela, le fait que  $I_{MAX}$  varie linéairement avec la concentration en médiateur obéit au modèle de Michaelis-Menten. En effet, ce modèle décrit la vitesse maximale de la cinétique enzymatique de la manière suivante :

$$V_{MAX} = k_2[E]_{tot}$$

Où  $[E]_{tot}$  est la concentration totale en enzymes actives et  $k_2$  la constante de cinétique apparente de l'étape de formation du produit de la réaction enzymatique :



Ecrit de cette manière, le modèle met en avant la cinétique de transformation du substrat de l'enzyme mais ne prend pas en compte le co-substrat régénérant l'enzyme. Il est en revanche possible de corriger ce modèle en remplaçant  $k_2$  par le produit  $k_2^0[\text{co-substrat}]$  qui caractérise donc la constante de réaction entre l'enzyme et le co-substrat. De cette manière, on obtient donc :

$$V_{MAX} = k_2^0[\text{co-substrat}][E]_t$$

Cette équation atteste bien que  $V_{MAX}$  varie linéairement avec la concentration en co-substrat. Dans le cas de notre expérience, cela correspond bien à l'évolution linéaire de  $I_{MAX}$  avec la concentration en 1,4-NQ.

Afin de connaître la quantité de GOx réellement impliquée dans la catalyse, des mesures en solution ont été effectuées et comparées avec les performances de la protéine confinées dans la bioélectrode, en l'absence de NQ. Pour ce faire des mesures de chronoampérométrie à 0,6 V utilisant une électrode de platine ont permis de détecter l'activité réelle des GOx présentes dans le milieu *via* le suivi de l'oxydation de  $H_2O_2$  formé consécutivement à l'ajout de glucose en présence de  $O_2$ , à la manière d'un biocapteur classique<sup>21</sup>. Ces expériences ont notamment permis d'estimer l'activité réelle de l'enzyme dans la matrice de MWCNTs. En saturant la solution en substrat, l'activité de l'enzyme dans l'électrode a été évaluée à 488,5 mU, soit 2492 mU.cm<sup>-2</sup> par rapport à l'enzyme en solution dont l'activité est de 139 U.mg<sup>-1</sup> (activité testé en solution sur 2 µg de GOx). En faisant l'approximation que l'activité de l'enzyme immobilisée est équivalente à celle en solution, la quantité de GOx actives dans la catalyse serait de l'ordre de 3,51 µg sur les 15 mg utilisés, soit 0,02% d'enzymes actives dans la bioanode. Ceci montre que peu d'enzymes sont en réalité atteintes par le glucose qui est rapidement consommé par

les couches de GOx présentes à la surface de l'électrode. Les protéines situées plus en profondeur de la nanostructure ne sont pas utilisées pour l'oxydation, même avec le dioxygène en tant que co-substrat.

En prenant toujours en compte l'activité de l'enzyme ( $139 \text{ U.mg}^{-1}$ ), il est possible de calculer le courant maximum délivré dans le cas où toutes les enzymes étant possiblement régénérées par le dioxygène peuvent également l'être par la 1,4-NQ par médiation. Ces  $3,51 \text{ } \mu\text{g}$  de GOx sont en théorie capables d'oxyder  $0,488 \text{ } \mu\text{mol}$  de glucose par minute à pH7 et à  $37^\circ\text{C}$ , ce qui correspond à la collecte de  $9,8.10^{15}$  électrons par seconde. La charge correspondante équivaut à  $1,568 \text{ mC}$  par seconde, converti en courant cela donne  $1,568 \text{ mA}$ . Or le courant maximum atteint par l'anode est de  $0,65 \text{ mA}$  dans le cas de l'anode à membrane PPy-PSS. Par calcul du rapport des deux valeurs, la quantité d'enzymes connectées par médiation et éventuellement par DET correspond à 41% de la totalité des protéines utilisées lors de la préparation de la bioélectrode.

De la même manière, ce calcul permet d'estimer l'activité de la GOx pour l'oxydation du glucose en utilisant la 1,4-NQ comme co-substrat à  $57 \text{ U.mg}^{-1}$  dans le cas du plus fort ratio 1,4-NQ/GOx.

#### II.2.4 Autres médiateurs de types « quinone »

Les résultats précédents démontrent l'intérêt de l'utilisation d'un médiateur rédox au sein de la matrice tridimensionnelle afin de connecter efficacement la GOx. Plus particulièrement, les densités de courant catalytique obtenues (jusqu'à  $3 \text{ mA.cm}^{-2}$ ) ont démontré l'excellente propriété de la NQ à agir comme relais électronique entre la protéine et la matrice de CNTs. Cependant, la fuite du médiateur en solution, même contrôlé après quelques jours, reste problématique. Ce facteur limite en effet les quantités de médiateurs pouvant être incorporé à l'électrode. Une solution envisageable afin de contourner le problème de la fuite du médiateur en solution serait d'immobiliser la sonde rédox. L'immobilisation sur les CNTs des chaînes polymériques simples ou électrogénérés pourrait permettre l'obtention de meilleures stabilités dans le temps et biocompatibilité.

La NQ s'est avérée être un médiateur d'intérêt pour la connexion indirecte de la GOx. Cependant, les possibilités de modifications chimiques de cette molécule, sans interférer sur ses propriétés rédox, sont minimales. Il existe une grande variété de structure de type « quinone » présentant des propriétés rédox proches et donc potentiellement intéressantes pour connecter la GOx, comme la NQ le système peut être simplifié en :





La série de médiateur comprend différents types de structures comportant un motif quinone. Les structures dérivées de la benzoquinone (BQ) (Figure II.9), de la naphtoquinone (NQ) (Figure II.10) ou encore de la phénanthroline quinone (PQ) (Figure II.11):

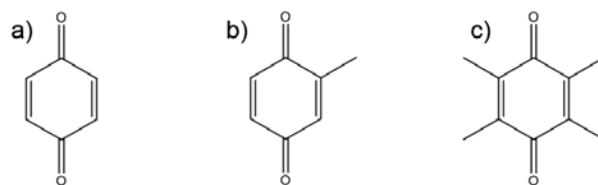


Figure II.9 : Structure de a) 1,4-benzoquinone b) 2-méthyl-1,4-benzoquinone et c) 2,3,5,6-méthyl-1,4-benzoquinone

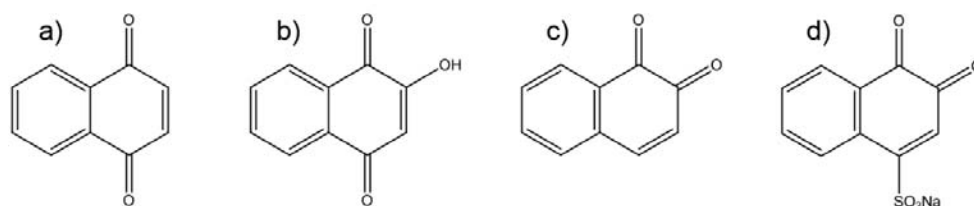


Figure II.10 : Structure de a) 1,4-naphtoquinone b) 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone c) 1,2-naphtoquinone et d) 1,2-naphtoquinone-sulfonate de sodium

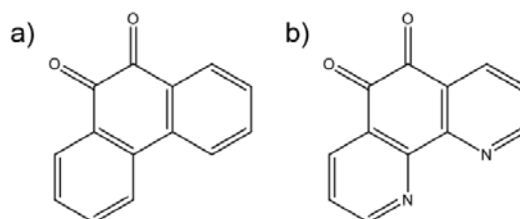


Figure II.11 : Structure de a) 9,10-phenanthrenequinone et b) 1,10-phenanthroline-5,6-dione

Pour chacun des motifs, des groupements chimiques rendent la modification du motif envisageable en cas de bonne performance en électrodes 3D.

Par chronoampérométrie et par mesure du potentiel d'abandon des électrodes en présence de substrat, les 9 espèces ont été évaluées en fonction de leur capacité à connecter la GOx. L'objectif ici est de trouver une espèce capable de fixer un potentiel d'abandon le plus proche possible du couple FAD/FADH<sub>2</sub> tout en permettant une bonne catalyse d'oxydation du glucose. Les expériences ont été effectuées sur des disques de CNTs à double paroi (DWCNTs) (35mg) de 1 cm<sup>2</sup> de surface, comprenant 15 mg de GOx, 10 mg de Cat et 3 mmol de quinone. Les DWCNTs sont plus hydrophobes que les MWCNTs et permettent une fabrication simple d'électrodes 3D avec une excellente tenue mécanique. L'un des avantages de cette technique est la conception d'électrodes ayant des surfaces d'échange avec le milieu plus important, les dimensions de ces bio-électrodes sont alors de 1 cm<sup>2</sup> et de 2 mm d'épaisseur.

Ces électrodes ont été utilisées uniquement dans le but de passer au crible une série de médiateurs afin de déterminer le plus compétitif en vue d'éventuelles modifications chimiques pour l'immobilisation de l'espèce rédox sur la surface de MWCNTs.

Les courants catalytiques ont été mesurés par chronoampérométrie à 0,3 V Vs SCE en fonction de l'addition de glucose jusqu'à saturation. Les potentiels d'abandon pour chaque électrode ont été mesurés en présence de la concentration de glucose correspondant à  $I_{\max}$ .

Tous les résultats sont récapitulés dans le Tableau 1 :

<b>Médiateur</b>	<b><math>I_{\max}</math> (mA)</b>	<b>OCP (V)</b>	<b>Médiation</b>	<b>Modification</b>	<b>Intérêt</b>
<b>1,4-benzoquinone</b>	10.4	-0.14	OUI	+	++
<b>2-méthyl-1,4-benzoquinone</b>	12.8	-0.18	OUI	-	++
<b>Tetraméthyl-1,4-benzoquinone</b>	0.05	0.2	NON	-	-
<b>1,4-naphtoquinone</b>	1.55	-0.25	OUI	+	+
<b>1,2-naphtoquinone</b>	7.1	-0.22	OUI	+	+
<b>2-hydroxy-1,4-naphtoquinone</b>	1.5	-0.35	OUI	++	+
<b>1,2-naphtoquinone-sulfonate de sodium</b>	3.0	-0.06	OUI	+	-
<b>9,10-phenanthrenequinone</b>	1.1	-0.21	OUI	-	+
<b>1,10-phenanthroline-5,6-dione</b>	9.5	-0.17	OUI	+++	+++

Tableau 1

L'avant dernière colonne estime la possibilité de modifier chimiquement les médiateurs, pour éventuellement leur incorporer un groupement d'ancrage, sans influencer sur le potentiel rédox de la molécule. La dernière colonne note l'intérêt de chaque médiateur en fonction de tous les paramètres présentés dans le tableau.

De toute la série des quinones testées en électrodes 3D, la majorité d'entre elles connectent la GOx. Toutes ces espèces rédox sont donc, à l'exception de la 2,3,5,6-méthyl-1,4-benzoquinone (tMeBQ), des médiateurs potentiels de la GOx pouvant être incorporés aux bio-électrodes.

Recherchant les meilleures performances en termes de potentiel d'abandon et de courants catalytiques délivrés, une attention particulière a été portée sur la 2-méthyl-1,4-benzoquinone et 1,10-phenanthroline-5,6-dione qui possèdent un OCP de respectivement -0.18 et -0.17 V, en présence de glucose au sein de la bioélectrode, tout en délivrant un courant de catalyse maximum de l'ordre de 10 mA. Malgré la faible catalyse observée,  $I_{\max} = 1,5$  mA, avec le

dérivé 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone, la présence d'un groupement hydroxy rend possible la modification de ce médiateur, en outre le potentiel d'abandon est attractif à -0,35 V.

Outre ces propriétés de connexion de la GOx, ces molécules ont également la particularité de pouvoir être « modifiées » chimiquement et donc d'être potentiellement immobilisées sur la surface des CNTs, ce qui contournerait de manière élégante la fuite en solution du médiateur. Dans cette optique, la modification des dérivés 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone et 1,10-phenanthroline-5,6-dione a été entreprise dans le but de tester la possibilité d'obtenir un transfert médié avec la GOx après avoir immobilisé ces espèces sur la surface de l'électrode.

Chacun de ces dérivés a été modifié par l'incorporation d'un groupement pyrrole, permettant leur électropolymérisation sur les CNTs.

Afin de greffer sur électrode le dérivé 1,10-phenanthroline-5,6-dione, ce dernier a été intégré à un complexe de coordination. Dans un premier temps, deux motifs 1,10-phenanthroline-5,6-dione ont été coordonnés à un cation ruthénium. La sphère de coordination de ce complexe intermédiaire a ensuite été complétée par addition d'un troisième ligand de type bipyridine portant une fonction d'ancrage pyrrole. Cette synthèse a été effectuée avec un ligand portant une chaîne alkyl à 4 carbones (chaîne courte) comme espaceur et également avec un ligand modifié par une chaîne alkyl à 12 carbones (chaîne longue) (Figure II.12).

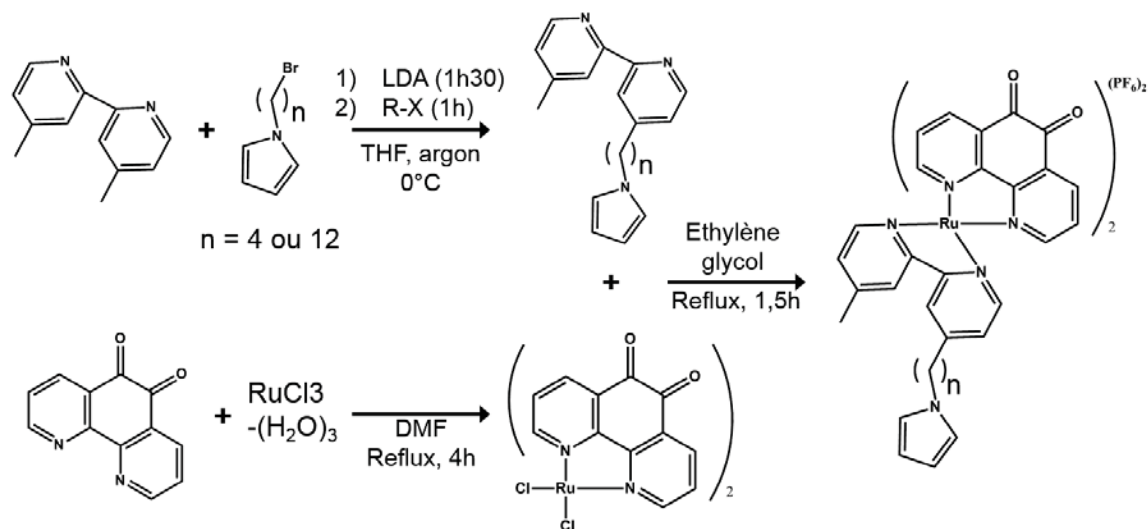


Figure II.12 : schéma réactionnel des trois étapes permettant la synthèse des complexes de ruthénium à chaîne courte et chaîne longue, envisagés pour connecter la GOx

La synthèse des complexes de Ruthénium comprend 3 étapes successives (Figure II.12). Brièvement, le ligand de 4-méthyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine est synthétisé par formation d'un organo-lithien sur la 4,4'-diméthylbipyridine et l'ajout d'un équivalent du dérivé 1-(4-bromobutyl)-pyrrole. Après purification sur silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  :acétonitrile, 9 ;1) le produit est obtenu pur sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 25%. Pour la synthèse du ligand

4-méthyl-4'-(12-dodecylpyrrole)-2,2'-bipyridine, la même procédure a été employée avec le dérivé bromé 1-(11-bromoundecyl)-pyrrole avec un rendement de 30%.

Le complexe intermédiaire Bis(1,10-phénanthroline-5,6-dione)Ru<sup>II</sup>Cl<sub>2</sub> est obtenu par condensation de RuCl<sub>3</sub>·(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> et de 2 équivalents de phendion dans DMF à reflux pendant 4h comme déjà décrits dans la littérature avec un rendement de 91%<sup>22</sup>.

Enfin, le complexe [(1,10-phénanthroline-5,6-dione)<sub>2</sub>(4-méthyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine) ruthenium(II)] hexafluorophosphate (Ru<sup>II</sup>PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)) a été synthétisé par reflux dans l'éthylène glycol d'un mélange équimolaire de Bis(1,10-phénanthroline-5,6-dione)Ru<sup>II</sup> et de 4-méthyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine pendant 1,5h. Le produit est ensuite précipité à froid par ajout d'une solution H<sub>2</sub>O saturé en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup>. Le précipité obtenu est filtré, lavé à H<sub>2</sub>O et séché à Et<sub>2</sub>O. Le complexe sous forme de poudre orange est obtenu pur et a été caractérisé par RMN <sup>1</sup>H, spectrométrie de masse et par UV-visible. Le rendement de cette dernière étape est de 78%. De même, la procédure a été utilisée pour synthétiser le complexe portant l'espaceur de 12 carbones avec un rendement de 76%.

Comme le ligand 1,10-phenanthroline-5,6-quinone, la modification du dérivé 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone a été effectuée par addition nucléophile de ce dernier sur un monomère pyrrole porteur d'un iode comme groupe partant.

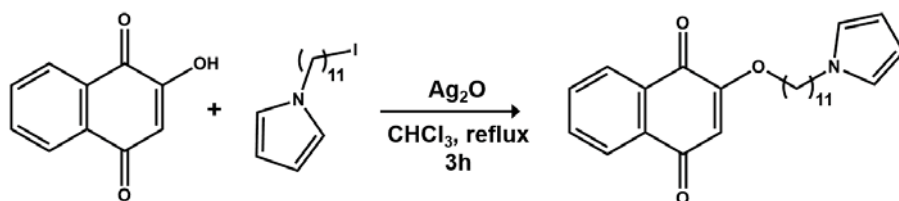


Figure II.13 : schéma de la synthèse employée pour modifier le dérivé 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone avec un monomère pyrrole à longue chaîne

La réaction d'addition nucléophile du dérivé 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone sur le 1-(11-iodoundecyl)-pyrrole a été réalisée en présence de Ag<sub>2</sub>O dans le chloroforme à reflux pendant 3h. L'huile obtenu a été chromatographiée sur colonne de silice (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 9 :1) pour donner le produit 2-((11-(pyrrole)undecyl)oxy)naphtalène pur (huile jaune) avec un rendement de 52%.

Ces médiateurs modifiés par des groupements pyrroles ont pu être électropolymérisés sur électrodes de MWCNTs. Cependant, aucuns de ces 3 dérivés n'a permis de médié le transfert électronique de la GOx, sur électrode plane, ou dans les électrodes nanostructurées de MWCNTs. Concernant les complexes de ruthénium, il est possible que l'encombrement stérique, cumulé à l'hydrophobicité de la chaîne alkyl servant d'espaceur, ne permette pas une bonne diffusion de la sonde rédox jusqu'au site actif de la protéine qui est lui-même enfoui dans la poche protéique de l'enzyme. Le dérivé 2-((11-(pyrrole)undecyl)oxy)naphtalène quant à lui, possède également une longue chaîne de nature hydrophobique qui peut diminuer les chances

d'accès au site actif de la protéine. Aussi, la modification du dérivé au niveau du cycle portant l'espèce rédox quinone peut également engendrer une orientation défavorable du médiateur.

L'absence de résultats positifs de cette série d'expérience nous a contraint pour le moment à utiliser la 1,4-NQ (non modifiée) qui est, à l'heure actuelle, la meilleure alternative pour l'obtention d'une bonne connexion électrique de la GOx au sein de l'électrode nanostructurée. La possible modification du dérivé benzoquinone, actuellement en cours au laboratoire pourrait peut-être permettre de contourner les problèmes rencontrés pour la connexion indirecte de la GOx par un médiateur immobilisé sur la surface des MWCNTs.

## II.3 Cathodes 3D à bases d'enzymes à cuivre

### II.3.1 Réduction de O<sub>2</sub> par les MCOs

Le même type de bioélectrodes décrites dans la partie précédente a également été employé pour concevoir des biocathodes pour la réduction du dioxygène à partir d'enzyme comprenant des centres cuivres dites « Multi copper oxidase » (MCOs) particulièrement utilisées pour l'élaboration de biocathode à oxygène<sup>12,23-25</sup>. Deux de ces enzymes ont été plus particulièrement étudiées.

La première enzyme étudiée est la Laccase (Lac). Il s'agit d'une enzyme à cuivre possédant donc 3 sites mono et dinucléaires : T1, T2 et T3. Il s'agit d'une des protéines rédox les plus utilisées dans les biopiles à la biocathode grâce à sa faculté de réduction totale de l'oxygène à 4H<sup>+</sup> et 4e<sup>-</sup> à de hauts potentiels (dépendants de l'organisme d'origine de l'enzyme).

Deux désavantages majeurs subsistent quant à l'utilisation de la laccase en milieu physiologique : son inhibition par les ions Cl<sup>-</sup> et ses propriétés acidophiles qui ne lui permettent pas d'être aussi active à pH neutre. Des alternatives sont donc à envisager pour pouvoir fournir une biocathode capable de travailler dans les conditions restrictives du milieu physiologique en vue d'alimentation de dispositifs implantables.

Une autre métalloenzyme à Cu, la PPO, possède des propriétés intéressantes. En effet, elle n'est pas inhibée par les ions Cl<sup>-</sup> et est active à pH neutre. Elle pourrait donc s'avérer être une alternative sérieuse à la Laccase pour l'élaboration de biocathodes fonctionnelles en milieu physiologique. A la différence de la laccase qui possède à la fois un site T1 mononucléaire et un site T2/T3 trinucéaire, la PPO possède un seul site T3 dinucléaire Cu<sup>II</sup>-Cu<sup>II</sup>, où s'effectue à la fois la réduction de O<sub>2</sub> et le transfert d'électron au substrat ou, dans le cas d'une bio-cathode à l'électrode<sup>12</sup>. Cette dernière a déjà été utilisée pour l'élaboration de bio-cathode à base de

composite graphite-enzyme par transfert électronique médiaté<sup>8</sup>. Malgré l'intérêt que pourrait présenter cette métalloprotéine dans l'élaboration de biocathode fonctionnelles en milieu physiologique, peu d'études décrivent à ce jour la connexion directe de PPO sur électrode<sup>26</sup>. La PPO est beaucoup moins utilisée dans les applications de bio-piles puisqu'à ce jour il n'existe aucun exemple de réduction électrocatalytique directe de O<sub>2</sub> par la PPO sur électrode et que les médiateurs rédox utilisés possèdent des potentiels rédox particulièrement bas en réduction.

La PPO a pour substrats naturels les polyphénols qu'elle oxyde catalytiquement en *o*-quinone tout en réduisant O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O par un processus à 4 e<sup>-</sup>. De nombreux mécanismes se basant à la fois sur des études conduites sur la protéine en elle-même et sur des complexes de coordination Cu-Cu mimant le site actif T3 de l'enzyme décrivent ces cycles catalytiques<sup>27</sup>.

La tyrosinase catalyse la formation d'ortho-quinone (*o*-quinone) à partir d'un monophénol ou d'un ortho diphénol. Pour ce faire, deux hypothèses de routes catalytiques ont été décrites. La première dite « monophénolase » permet la catalyse d'oxydation d'un monophénol en *o*-quinone correspondant à une oxydation à 4 e<sup>-</sup> conduisant à la production de deux molécules de H<sub>2</sub>O à partir d'une molécule de O<sub>2</sub>. La deuxième constitue le cycle « diphénolase » au cours duquel l'oxydation de 2 motifs *o*-phénol a lieu pour une réduction complète de O<sub>2</sub>. Dans les deux mécanismes la réduction O<sub>2</sub> est totale, même si réalisée en 2 étapes successives dans le cas du cycle diphénolase et le produit formé est toujours une *o*-quinone (Figure II.14).

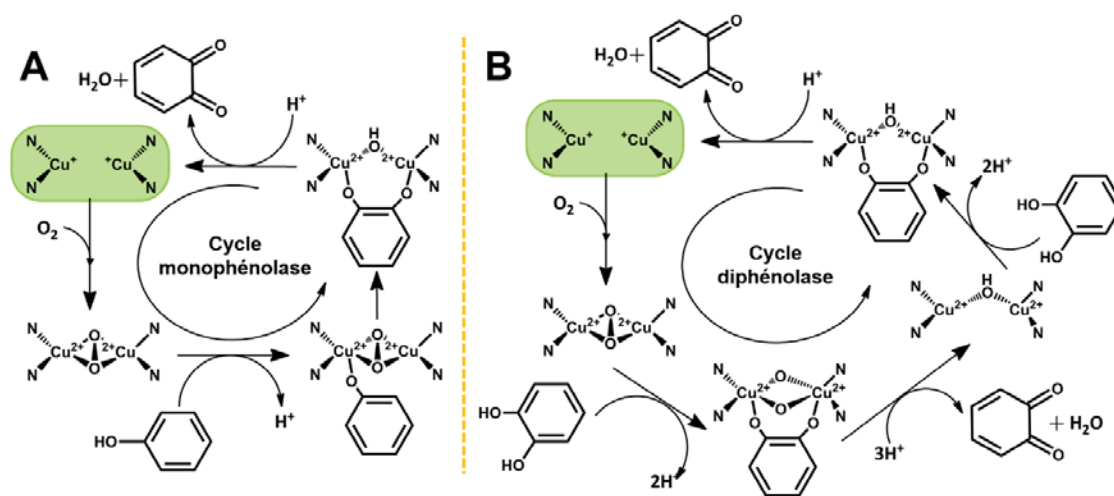


Figure II.14 : Mécanismes catalytiques monophénolase (A) et diphénolase (B) de la PPO, repris de Solomon et al.<sup>28</sup>

Bien que la laccase ait déjà été connectée sur matrice 3D de CNTs auparavant<sup>10</sup>, ces travaux se sont ensuite focalisés, dans un premier temps, sur l'optimisation de cette biocathode, son étude en CV et sa comparaison avec la PPO.

La connexion directe de la PPO sur les CNTs a donc été étudiée dans un second temps afin d'effectuer la réduction totale, à 4 e<sup>-</sup>, du dioxygène sur électrode ou le donneur d'électron n'est plus un substrat phénolique mais l'électrode.

### II.3.2 Cathode MWCNTs/Laccase en transfert direct

Comme dans le cas de la GOx, la protéine, Laccase de *Trametes versicolor* (15 mg) et les MWCNTs (35 mg) sont mixés afin d'obtenir une pâte composite qui est ensuite compressée pour donner la bioélectrode sous forme d'un disque de MWCNTs de 0,5 cm de longueur et 0,2 cm<sup>2</sup> de surface géométrique. A la différence des bio-anodes décrites précédemment, une membrane solide de Nafion est déposée à la surface de l'électrode. Elle permet une excellente résistance mécanique de la nanostructure tout en étant perméable à O<sub>2</sub> et à l'électrolyte.

Les performances de la biocathode ont dans un premier temps été étudiées par CV pour suivre l'activité catalytique de la laccase vis-à-vis de la réduction de O<sub>2</sub> à pH 5,5 ainsi qu'à pH 7 (Figure II.15 A et B).

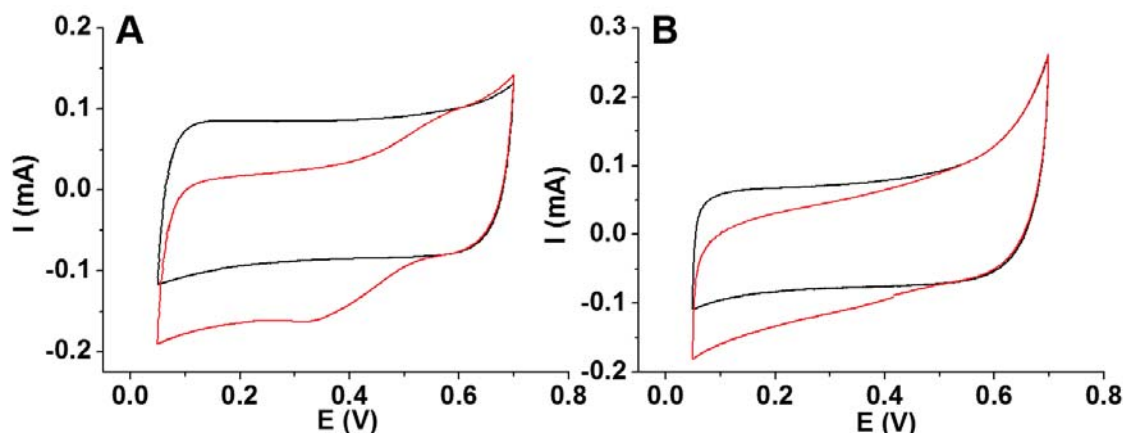


Figure II.15 : A) CV de la bio-cathode MWCNTs/Lac sous argon (courbe noire) et sous bullage d'oxygène (courbe rouge) dans TP 0,2 M, pH 5,5, 25°C ( $\nu = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) B) CV de la bio-cathode MWCNTs/Lac sous argon (courbe noire) et sous bullage d'oxygène (courbe rouge) dans TP 0,2 M, pH 7, 25°C ( $\nu = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Les mesures de CV sont réalisées à faibles vitesses de balayage ( $0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) pour atténuer la contribution de la composante capacitive du composite MWCNTs/Lac. Sur la CV effectuée à pH 5,5 (Figure II.15A), en présence de dioxygène, une vague de réduction catalytique apparaît à 0,55 V, ce qui est très proche des valeurs théoriques pour le site Cu mononucléaire T1 observées dans la littérature<sup>12</sup>. La CV réalisée à pH 7 (Figure II.15 B) montre également, en présence de dioxygène, l'apparition d'une vague de réduction électrocatalytique de O<sub>2</sub> débutant à 0,5 V. La catalyse est moins importante que celle observée à pH 5. En particulier, la stabilisation du courant de réduction est bien moindre qu'à pH 5.



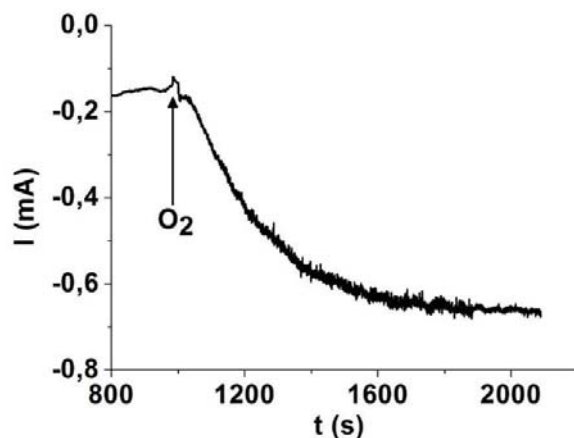


Figure II.16 : Mesure de chronoampérométrie à 0,3 V Vs ECS de la biocathode MWCNTs/Lac avec ajout d'un bullage de  $O_2$  dans TP 0,2 M, pH 7, 25°C sans et avec ajout d'un bullage de  $O_2$

En parallèle, des chronoampérométries à 0,3 V Vs SCE à pH 7 ont été opérées. Après le bullage d'oxygène dans la cellule, le courant cathodique passe de 150  $\mu A$  à 650  $\mu A$  en quelques minutes. Ce temps de réponse peut s'expliquer par l'accessibilité réduite des enzymes causée par la membrane de Nafion et la matrice poreuse de CNTs (Figure II.16). Néanmoins, les courants obtenus de l'ordre de 3.25 mA.cm<sup>-2</sup> sont parmi les plus importants rapportés dans la littérature.

### II.3.3 Cathode MWCNTs/Tyrosinase en transfert direct

Les bioélectrodes de PPO ont été élaborées dans les mêmes conditions que celles à base de Lac avec 5 mg de tyrosinase et 20 mg de MWCNTs donnant un disque de 1 mm d'épaisseur et de 5 mm de diamètre.

La PPO étant fonctionnelle en conditions physiologiques, toutes les études électrochimiques ont été effectuées à pH 7 dans le tampon phosphate.

Comme précédemment, les bioélectrodes ont été caractérisées par CV et par chronoampérométrie (Figure II.17 A et B).

La comparaison des CVs réalisés sous argon et sous oxygène de la biocathode PPO mettent en évidence une réduction électrocatalytique de l'oxygène avec des potentiels à courant nul de l'ordre de 0,36 V à pH 7 (Figure II.17 A). Ces potentiels rédox correspondent à ce qui avait pu être observé par Yaropolov et al. sur électrode de graphite<sup>26</sup>. Cette valeur de potentiel rédox est identique à la valeur mesurée par Makino et al. par titration en 1974 qui était également de 0,36V<sup>29</sup>.

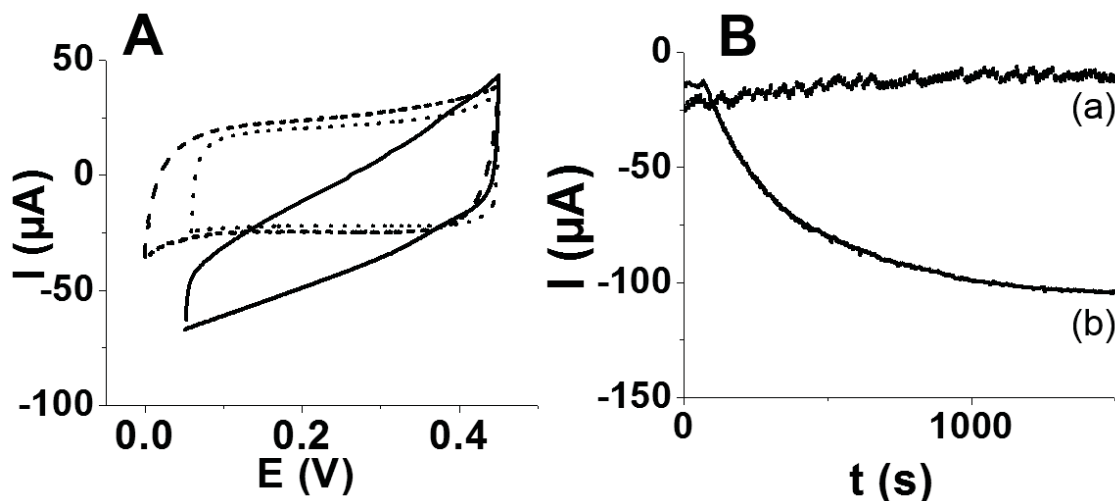


Figure II.17 : A) CV de la biocathode MWCNTs/PPO sous argon (courbe en pointillés) et sous dioxygène (trait plein) et disque de MWCNTs seul (tirets) dans TP 0,2 M, pH 7 à 25°C ( $v = 0,2 \text{ mV.s}^{-1}$ ) B) Chronoampérométrie à 0 V de la cathode MWCNTs/PPO (b) et d'un disque de MWCNTs seul (a) avec ajout d'un bullage d'oxygène dans TP 0,2 M, pH 7 à 25°C

Comme pour la Lac, le courant catalytique de réduction de  $O_2$  par la PPO a été étudié par chronoampérométrie à 0V (Figure II.17B). Consécutivement à l'ajout d'un bullage d'oxygène dans la solution, un courant catalytique cathodique de 110  $\mu A$ , soit  $550 \mu A.cm^{-2}$ , est observé. Le potentiel d'électroréduction de  $O_2$  par la PPO est donc nettement plus bas que celui opéré par la Lac, même à pH 7. Aussi, les courants de réduction obtenus par mesure de chronoampérométrie sont également plus faibles avec la PPO d'un facteur 6.

Du fait des faibles vitesses de balayage imposées par la structure de l'électrode et afin d'approfondir l'étude du transfert direct d'électrons de la PPO aux CNTs, des tests d'inhibitions ont été réalisés. L'effet de deux inhibiteurs connus de la protéine, l'acide benzoïque et le cyanure de sodium a donc été étudié. Ces deux inhibiteurs ne sont pas naturellement présents dans le milieu physiologique, mais leur comportement vis-à-vis de la protéine peut permettre de valider l'hypothèse d'un transfert électronique direct avec l'électrode. L'acide benzoïque est supposé être un inhibiteur compétitif de la PPO vis-à-vis de l'oxydation des polyphénols mais non compétitif vis-à-vis de la réduction du dioxygène alors que le cyanure de sodium est compétitif de la réduction de  $O_2$ <sup>30</sup>. Dans cette optique, des ajouts de concentrations croissantes en chaque inhibiteur ont été suivi durant une décharge cathodique à 0 V Vs SCE en présence d'oxygène (Figure II.18 A).

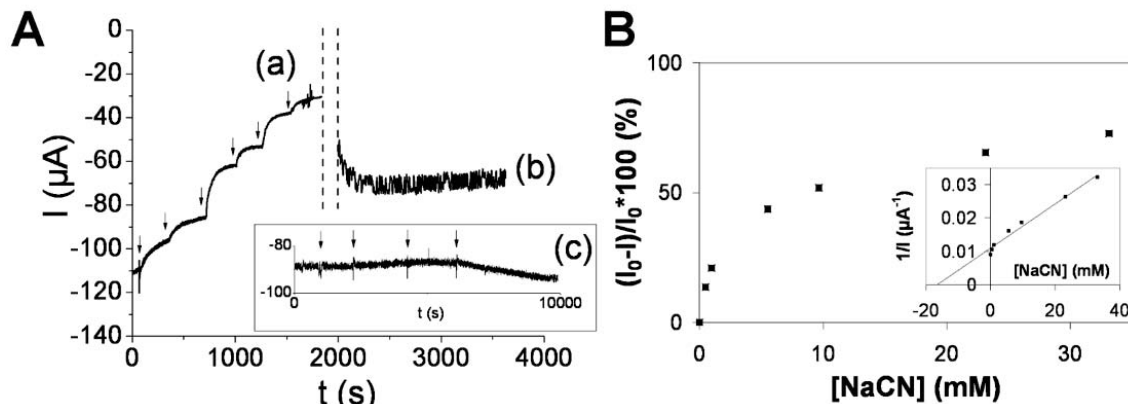


Figure II.18 : A) (a) Réponse de la bio-cathode MWCNTs/PPO à l'ajout de concentration croissante en NaCN à 0 V (b) réponse à 0 V après plusieurs lavage de l'électrode et après retrait du NaCN (c) réponse à 0 V à l'ajout de d'acide benzoïque dans TP 0,2M pH 7 à 25°C B) Quantification de l'inhibition par NaCN par ratio de  $(I-I_0)/I_0$  où  $I_0$  correspond au courant initial maximum de réduction de  $O_2$  en l'absence d'inhibiteur. Insert : tracé de Dixon de  $1/I$  en fonction de [NaCN] dans TP 0,2M, pH 7 à 25°C

Comme attendu, l'addition d'une quantité croissante de NaCN dans le milieu induit une chute du courant de réduction de  $O_2$  proportionnelle à la concentration en inhibiteur (Figure II.18 Aa). En revanche, l'addition d'acide benzoïque n'a aucun effet sur le courant de réduction si ce n'est un effet légèrement bénéfique sur la catalyse en raison de l'acidification du milieu consécutif à l'ajout d'acide benzoïque (Figure II.18 Ac). Ces deux résultats permettent de confirmer la présence d'un transfert direct d'électrons entre l'enzyme et les CNTs lors de la réduction électrocatalytique de  $O_2$ . La courbe de Dixon obtenue grâce aux courants relevés à chaque ajout de l'inhibiteur NaCN met en avant une cinétique de type Michaelis-Menten de dépendance à la concentration en inhibiteur de la PPO connectée (Figure II.18 B). Elle permet également d'obtenir la constante d'inhibition compétitive apparente  $K_i^{app}$  pour le cyanure de l'ordre de 17mM. Cette valeur est supérieure à celle obtenue en solution ( $13\mu M$ )<sup>30</sup>. Ceci peut en partie s'expliquer par une lente diffusion de l'inhibiteur au sein même de la matrice 3D et donc jusqu'au centre dicuivre T3. Il s'agit du même phénomène décrit dans la partie précédente pour les différentes membranes utilisées à l'anode GOx-NQ. Le fait que la membrane de Nafion soit chargée négativement amplifie d'autant plus la limitation de diffusion des ions  $CN^-$ .

De plus après lavage et réutilisation de la bioélectrode en électrolyte seul et sous oxygène la cathode PPO retrouve 65% du signal de réduction initial montrant la réversibilité de l'inhibition (Figure II.18 Ab)<sup>31</sup>. Ce pourcentage assez faible peut s'expliquer par la difficulté d'effectuer un rinçage efficace de la biocathode nanostructurée ayant été en contact avec l'inhibiteur. Comme précisé précédemment, la diffusion des ions  $CN^-$  au travers de la membrane n'est pas favorisée par le caractère anionique du polymère de Nafion. On peut donc supposer que certaines enzymes restent inhibées par les traces de  $CN^-$  toujours présent dans l'électrode compressée. Cependant, tous ces résultats confirment de manière indiscutable la connexion directe entre le site T3 de la Tyrosinase et la surface des CNTs.

Le mécanisme réactionnel de la tyrosinase par rapport à ses substrats naturels (les polyphénols) a été grandement étudié ces dernières années et il existe donc des hypothèses concernant son mode d'action et plus particulièrement concernant l'étape critique de l'activation de  $O_2$ <sup>28,32</sup>.

En revanche elle n'a encore jamais été connectée directement sur électrode pour réduire électrocatalytiquement  $O_2$ .

Sur la base des intermédiaires décrit pour la catalyse des phénols, il est possible de proposer quelques étapes du cycle électro-catalytique de réduction du dioxygène par la PPO sur électrode de MWCNTs (Figure II.19).

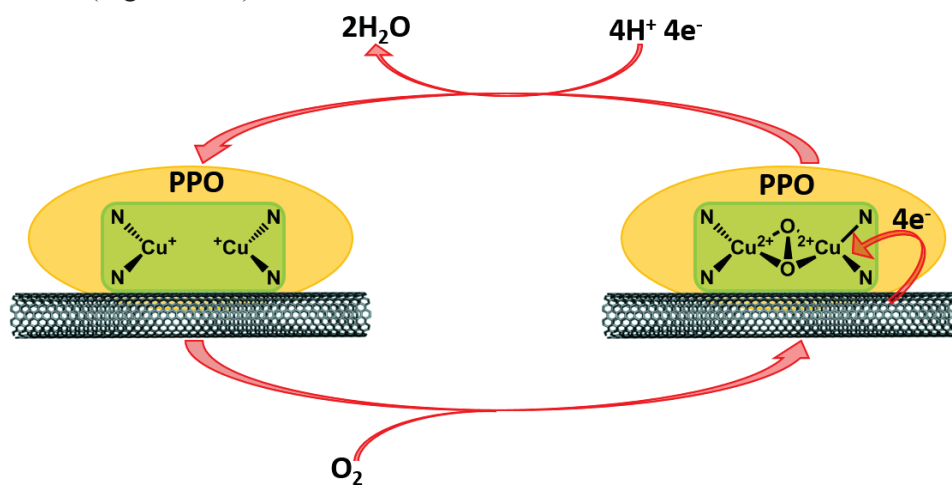


Figure II.19 : Schéma du cycle d'électrocatalyse enzymatique de réduction de  $O_2$  par la PPO sur matrice de CNTs

Le site T3 dicuivre de la PPO est le site de la réaction d'oxydation des substrats naturels phénoliques de l'enzyme et, de manière concomitante, de la réduction de  $O_2$ . Comme pour le cycle catalytique de la protéine vis-à-vis de ses substrats, l'enzyme sous la forme réduite  $Cu^+-Cu^+$  permet la fixation d'une molécule de dioxygène pour former un pont peroxy. Le dicuivre alors oxydé  $Cu^{II}-Cu^{II}$ , va récupérer les électrons de l'électrode pour réduire  $O_2$  en  $H_2O$  par un processus à 4 électrons et 4 protons au total. D'après les expériences précédentes, la réduction de  $O_2$  a bien lieu, mais il est difficile, en utilisant uniquement des mesures de CV et des mesures en chronoampérométrie, de savoir si la réduction du dioxygène se fait en plusieurs étapes, comme c'est le cas lors de l'oxydation des dérivés phénoliques par la PPO.

En termes de performances catalytiques, la Lac semble beaucoup plus intéressante pour l'élaboration de bio-piles 3D puisqu'elle permet l'obtention de forts courants de catalyse à de faibles surtensions.

Cependant, cette bio-cathode à base de laccase risque de perdre de son activité en milieu physiologique. En effet, elle est fortement inhibée par la présence d'ions  $Cl^-$  et est bien moins active à pH 7,4. Dans ces conditions, la PPO présente l'avantage de ne pas être inhibée par les chlorures et de rester active à pH physiologique. Elle pourrait donc s'avérer être une alternative

à la Laccase pour la conception de bio-cathodes stables en conditions d'implantation dans l'animal, malgré un potentiel plus bas et des courants cathodiques moins importants.

La bioélectrode à base de PPO a été conservée et ses performances ont été évaluées sur plusieurs jours après la conception de la cathode (Figure II.20).

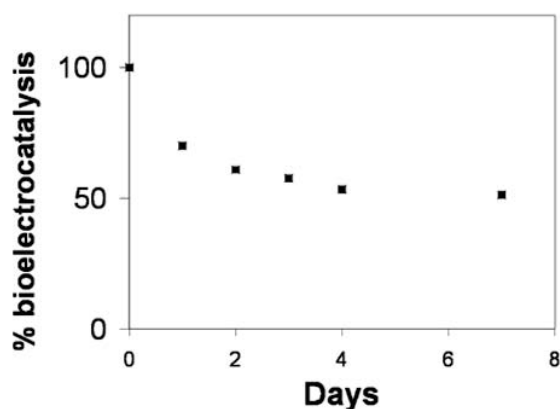


Figure II.20 : Pourcentage de courant catalytique de réduction de  $O_2$  maximum délivré par la bio-cathode MWCNTs/PPO obtenu par chronoampérométrie à 0 V pendant 7 jours

Des mesures de décharges à 0V ont été effectuées chaque jour pendant 7 jours. La biocathode perd 30% d'activité lors du premier jour. Ceci peut être en partie expliqué par la lente diffusion de l'électrolyte au sein de la matrice 3D provoquant une désorientation ou une désorption de la protéine induisant une perte d'efficacité du transfert électronique entre le site T3 et les MWCNTs. Après une semaine, la cathode est encore capable de délivrer 50% du courant catalytique initial. Ceci confirme, en parallèle avec la bonne connexion directe entre la PPO et l'électrode de CNTs, l'excellent confinement de l'enzyme au sein de la bio-électrode de MWCNTs.

## II.4 Biopiles GOx-NQ / Lac ; GOx-NQ/PPO

Des précédentes expériences, la fabrication d'une bioanode utilisant la GOx en transfert indirect et deux biocathodes utilisant la Lac et la PPO en transfert direct ont été décrites.

Ces bioélectrodes sont envisagées à terme, pour la conception de biopiles Glucose- $O_2$  pour des applications dans l'implantable biomédical. Afin de déterminer les meilleures candidates pour l'alimentation de dispositifs, deux combinaisons de bioanode/biocathode ont été étudiées, respectivement GO-NQ/Laccase et GOx-NQ/PPO.

## II.4.1 Performances des biopiles GOx-NQ/Laccase et GOx-NQ/PPO

L'anode GOx/1,4-NQ a été combinée avec une cathode constituée de Laccase et basée sur la réduction directe du dioxygène.

Cette bio-pile a été caractérisée à pH 7, 37°C et en présence d'oxygène (Figure II.21).

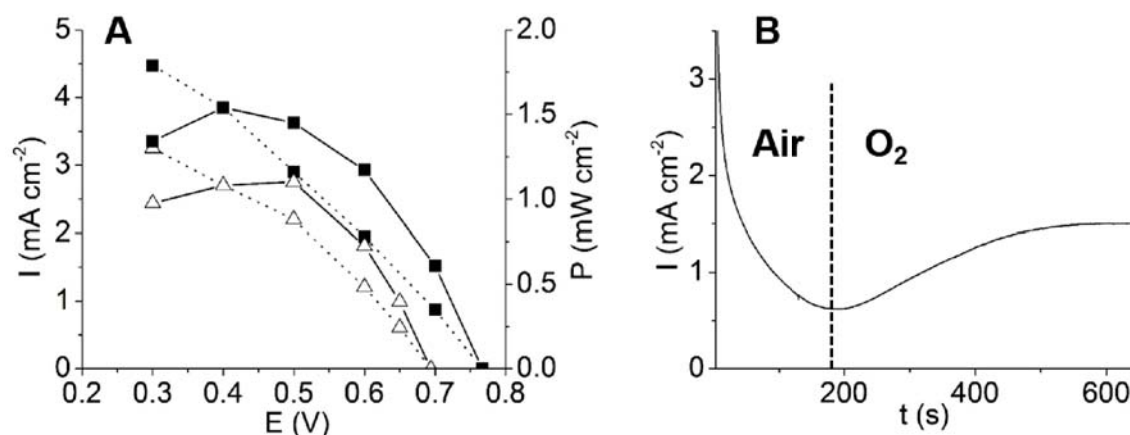


Figure II.21 : A) Courbes de puissance (trait plein) et de polarisations (pointillés) obtenus pour des décharges de 60 secondes à potentiel constant en milieu saturé en air (triangles blancs) et en O<sub>2</sub> (carrés noirs) en présence de 50 mM de glucose dans TP 0,2 M, pH 7 à 37°C B) Décharge pendant 10 minutes à 0,6 V de la pile MWCNTs/GOx-NQ/Lac sous air puis bullage de O<sub>2</sub> et en présence de 50 mM de glucose dans TP 0,2M, pH 7 à 37°C

La biopile a été caractérisée par chronoampérométrie. Les décharges opérées à différents potentiels ont permis d'obtenir les valeurs de puissances pour chaque potentiel de décharge (Figure II.21 A). Ces valeurs ont permis de tracer la courbe de puissance indiquant le comportement de la biopile lors de décharges successives d'une durée de 60 secondes (fixé de manière à atteindre un courant quasi-stationnaire après ce temps de décharge). Ces décharges ont été effectuées dans une solution sous air mais aussi saturée en O<sub>2</sub> et à 50mM de glucose. Ces expériences ont pour but de donner une information sur l'effet de la concentration en O<sub>2</sub> pour la catalyse. Si une solution saturée en O<sub>2</sub> induit de meilleures conditions pour la biocathode, elle peut aussi avoir un effet néfaste sur la catalyse à l'anode puisque O<sub>2</sub> est également le substrat naturel de la GOx. Cependant, la série de décharge permet d'observer que la présence en O<sub>2</sub> mène à de meilleures performances pour la biopile. En effet, dans les conditions saturante en O<sub>2</sub> et saturante en air, on observe une augmentation de la f.e.m globale de la pile de 80 mV. Cette augmentation induit également une hausse de la puissance maximale de la pile qui passe de 1,1 mW.cm<sup>-2</sup> (à 0,5 V) à 1,5 mW.cm<sup>-2</sup> (à 0,4 V). Ce phénomène a également pu être observé par chronoampérométrie (Figure II.21 B). A 0,6 V, 37°C, pH7 et sous air le courant catalytique se stabilise à 0,6 mA.cm<sup>-2</sup>. L'ajout d'oxygène permet, après lente diffusion du substrat vers l'enzyme dans la bioélectrode nanostructurée et à travers la membrane de Nafion, de doubler le courant catalytique de la bio-pile et d'obtenir 1,50 mA.cm<sup>-2</sup>.

Cette augmentation souligne aussi le caractère limitant de la biocathode à laccase en milieu non saturé en O<sub>2</sub>.

Dans des conditions similaires, la bio-pile GOx-NQ/PPO a elle aussi été caractérisée (Figure II.22).

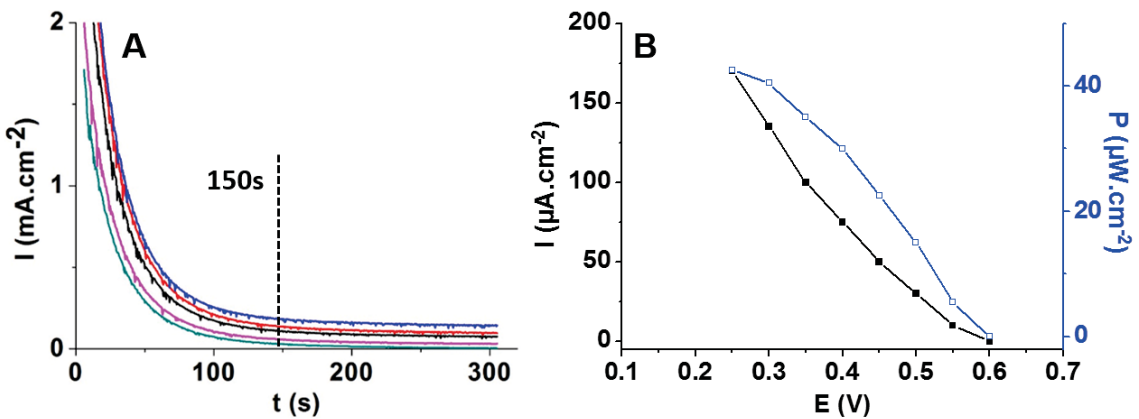


Figure II.22 : A) Décharge de 5 minutes à différents potentiels de la pile GOx-NQ/PPO sous O<sub>2</sub> et en présence de 50 mM de glucose dans TP 0,2 M, pH7 à 37°C B) Courbe de puissance (trait plein) et de polarisation (pointillés) obtenu après décharges de 60 secondes sous O<sub>2</sub> et en présence de 50 mM de glucose dans TP 0,2 M, pH7 à 37°C

Depuis le potentiel d'abandon de la pile, soit 0,6 V, des décharges successives de 150 s (fixé de manière à atteindre un courant quasi-stationnaire) sont appliquées et l'évolution en fonction du courant est observée. La saturation en O<sub>2</sub> n'ayant d'effet sur les performances de l'anode, les décharges ont été opérées à saturation en oxygène pour permettre une contribution cathodique optimale. La courbe de puissances permet d'obtenir la puissance maximale de la bio-pile de 42 μW.cm<sup>-2</sup> à 0,25 V soit une puissance plus de 30 fois moins importante par rapport à la biopile GOx-NQ/Lac décrite précédemment.

Biopiles	f.e.m	$I_{\max}$ (mA.cm <sup>-2</sup> )	$P_{\max}$ (mW.cm <sup>-2</sup> )
GOx-NQ/PPO	0.6	0.17 à 0,25 V	0.042 à 0,25 V
GOx-NQ/Lac	0.78	4,5 à 0,3 V	1,5 à 0,4 V

Tableau 2

Le Tableau 2 récapitule les performances caractéristiques des deux piles étudiées. La bio-pile GOx-NQ/Lac est très nettement supérieure en termes de puissance et de potentiel auxquels elle est opérationnelle, même à pH 7.



## II.4.2 Stabilité en fonctionnement et stockage de la biopile GOx-NQ/Lac

Dans les récentes avancées dans l'implantation des biopiles chez le rat, le verrou majeur reste la stabilité en stockage et en fonctionnement des biopiles. A l'heure actuelle, les durées de vie ne dépassent pas 15 jours<sup>11</sup>. Afin de mieux connaître les limites du système d'électrodes composites MWCNTs/enzymes incluant la combinaison GOx-NQ à l'anode et Lac à la cathode, des mesures de décharges plus longues et de stabilité ont été envisagées.

En effet, si la stabilité de la décharge au cours d'un temps long permet de connaître les performances de la pile en décharge constante, il est aussi important de connaître la stabilité dans le temps et en stockage de la pile. En effet le concept de la biopile implique qu'elle soit réutilisable au maximum étant donné que ses apports en substrats sont constamment renouvelés au cours du temps.

Dans un premier temps, la biopile a été déchargée pendant une durée de 1h dans des conditions non limitantes en substrats, 50mM glucose et sous bullage d'O<sub>2</sub> (Figure II.23).

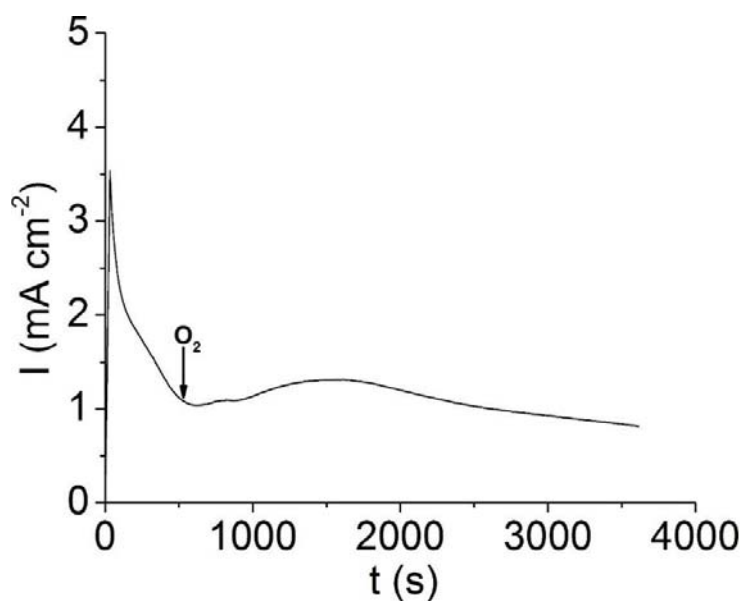


Figure II.23 : Décharge de la bio-pile à 0,5 V pendant 1 h avec ajout d'un bullage d'oxygène en présence de 50 mM de glucose dans TP 0,2M, pH 7 et à 37°C

La décharge est délivrée à un potentiel de 0,5 V et sur une durée de 1h. Sur la courbe de décharge on note dans un premier temps une pseudo stabilisation pendant les 6 premières minutes puis le courant chute. Comme observé précédemment cette baisse est liée à la non saturation de la solution en O<sub>2</sub> qui est rapidement consommé au sein de la cathode et qui doit être renouvelé. De ce fait, suite à l'ajout d'un bullage d'oxygène dans la solution on observe une hausse immédiate du courant fourni par la biopile. Ce courant se stabilise à 1,5  $\text{mA.cm}^{-2}$  avant de diminuer lentement jusqu'à 0,85  $\text{mA.cm}^{-2}$ .

En moyenne, sur la durée de la décharge ces courants correspondent à une puissance de  $0,56 \text{ mW.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ .

Une autre expérience a été menée afin de connaître la stabilité de la pile en stockage. Des mesures de potentiels des électrodes et des décharges courtes de piles ont été effectuées quotidiennement dans des conditions de stockage et d'utilisation en milieu neutre, à pH7 (Figure II.24).

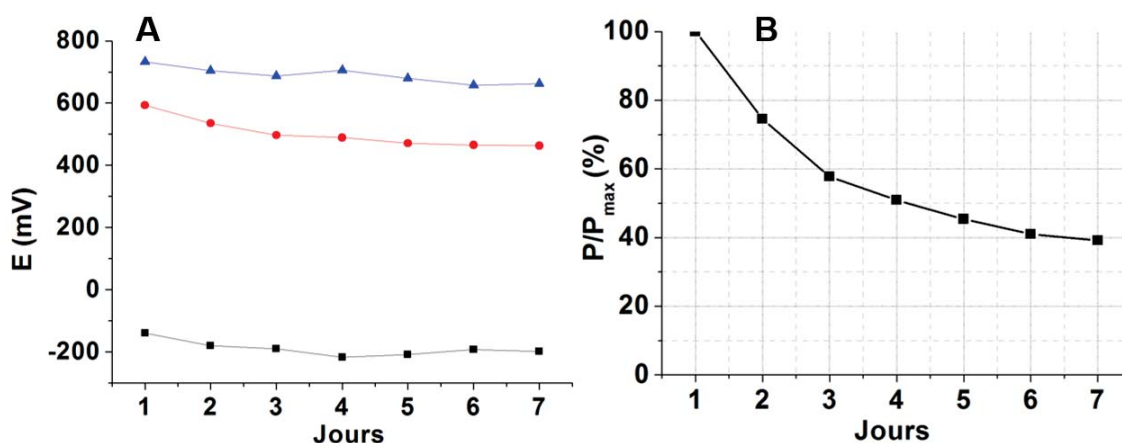


Figure II.24 : A) Evolution des potentiels d'abandon de la bio-pile GOx-NQ (courbe bleue), de l'anode (courbe noire) et de la cathode (courbe rouge) mesurés chaque jour en stockage dans TP 0,2 M, pH 7 en présence de 50 mM de glucose B) Ratios de la puissance restante obtenu chaque jour sur la puissance maximale obtenu au premier jour

Chaque jour, la mesure de potentiel est suivie d'une décharge à 0,6 V d'une durée de 60 s à pH 7, sous air et à 25°C.

La mesure quotidienne du potentiel de la pile ainsi que de chaque électrode individuellement permet de connaître la contribution en potentiel de chaque bio-électrode (Figure II.24 A). Si une des électrodes subit une détérioration de ses performances, cette dernière impactera directement les performances de la pile. Dans ces conditions, la bio-cathode voit son potentiel diminuer régulièrement de jours en jours et passe de 593 mV à J1 à 463 mV à J7. Ce phénomène peut s'expliquer par plusieurs hypothèses. La première serait liée au pH de la solution de stockage (pH 7) qui n'est pas le pH de prédilection de la Laccase, plus active à pH acide. Une autre hypothèse pourrait venir de la désorption de l'enzyme connectée, entraînant une perte de potentiel et une perte d'efficacité catalytique de la bio-cathode.

L'anode GOx-NQ suit une évolution radicalement différente. En effet, le potentiel baisse lors des 3 premiers jours de mesures jusqu'à -217 mV et fini par se stabiliser autour de -200 mV.

Consécutivement à ces mesures de potentiels, des décharges à 0,6 V sont effectuées (Figure II.24 B). A J1, le courant relevé au bout 60 s donne accès à une puissance de  $0,8 \text{ mW.cm}^{-2}$ . Après 7 jours, il reste 40% de la puissance de départ, soit  $0,3 \text{ mW.cm}^{-2}$ . Cette chute drastique

des courants débités par la biopile peut être directement reliée à la baisse du potentiel de la cathode.

Afin de vérifier l'effet du tampon de stockage de la cathode sur la stabilité de la biopile. Une série de mesures a été réalisée sur deux piles identiques GOx-NQ/Lac. Ces biopiles ont été utilisées quotidiennement dans des conditions très proches des conditions physiologiques visés, à savoir : pH 7, 5mM de glucose, 37°C et sans apport de O<sub>2</sub> autre que celui en solution. Le potentiel des biopiles a été suivi de jour en jour et des décharges avec une résistance fixe ont été réalisées. A la différence de l'expérience précédente, lors de la non utilisation des bioélectrodes elles ont été stockées dans leur tampon de prédilection respectif : pH 5 pour la cathode et pH 7 pour l'anode en présence de 5 mM de glucose.

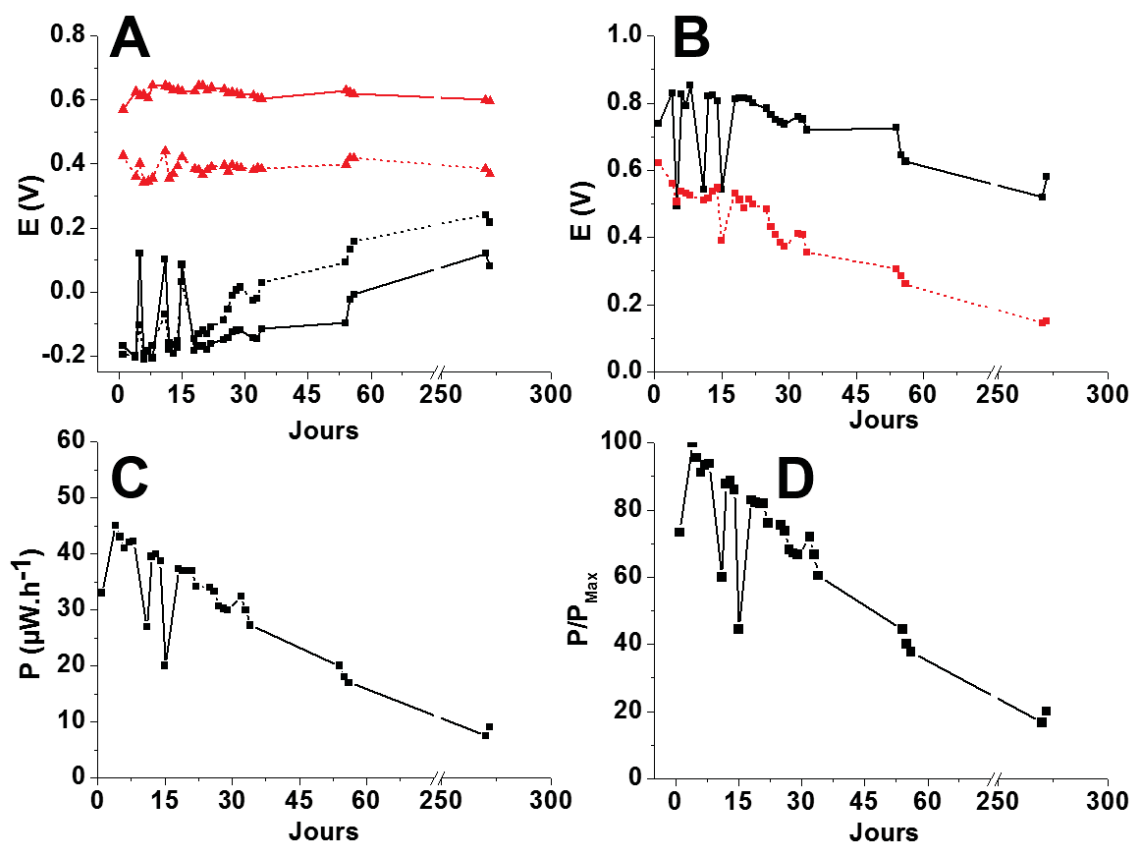


Figure II.25 : A) Valeurs mesurées des potentiels anodiques (courbes noires) et cathodiques (courbes rouges) avant décharge (trait plein) et après décharge (pointillés) à  $R = 10 \text{ k}\Omega$  pendant 1h sous air, en présence de 5mM de glucose dans TP 0,2 M, pH 7 à 37°C B) Valeurs mesurées des potentiels de la pile avant (trait plein) et après (pointillés) décharge  $R = 10 \text{ k}\Omega$  pendant 1h sous air, en présence de 5mM de glucose dans TP 0,2 M, pH 7 à 37°C C) Evolution de la puissance moyenne délivrée par la pile GOx-NQ/Lac sur une décharge à  $R = 10 \text{ k}\Omega$  pendant 1h sous air, en présence de 5mM de glucose dans TP 0,2 M, pH 7 à 37°C sur 60 jours D) pourcentage de puissance délivrée chaque jour par rapport à la puissance maximale obtenue sur 1 heure de décharge avec  $R = 10 \text{ k}\Omega$  pendant 1h sous air, en présence de 5mM de glucose dans TP 0,2 M, pH 7 à 37°C

La résistance a été fixée arbitrairement à une valeur élevée de 10kOhm de sorte de ne pas décharger les biopiles trop rapidement et de pouvoir étudier leur stabilité le plus longtemps possible. Avant et après chaque décharge les potentiels de chaque bio-électrodes ont été mesurés (Figure II.25 A).

Les potentiels respectifs de la bioanode et de la bio-cathode restent très stables lors des 20 premiers jours. Les valeurs de potentiels anodiques élevées observées aux jours 5, 11 et 15 (Figure II.25 A) sont attribuées à la diminution de la concentration de glucose consommé constamment par l'enzyme et donc également à la diminution du pH de la solution de stockage. En moyenne, les solutions de stockage ont été changées à intervalles réguliers de 4 jours. Lors des décharges, le potentiel cathodique semble varier de manière plus importante pendant les 20 premiers jours. A la suite de quoi la variation de potentiel pré et post décharge se stabilise à la cathode et s'amplifie très sensiblement à l'anode (Figure II.25 A). Ces variations de potentiel de chaque électrode sont corrélées avec les valeurs de f.e.m des piles mesurées également avant et après décharges (Figure II.25 B). Les potentiels de piles sont donc stables, de même pour une durée d'une vingtaine de jours, après quoi le potentiel de la biopile suit la perte de potentiel anodique.

Grâce à ces décharges effectuées à résistance fixe (10 kOhm), des puissances moyennes sur 1 h ont pu être calculées (Figure II.25C). Egalement, ces puissances varient très peu lors des 20 premiers jours d'utilisation, d'une valeur de  $45 \mu\text{W.h}^{-1}$  à  $37 \mu\text{W.h}^{-1}$ , soit 82% de la puissance initiale. En revanche, après 20 jours, et consécutivement aux pertes de f.e.m observées, les puissances diminuent jusqu'à atteindre la valeur de  $20 \mu\text{W.h}^{-1}$ , soit toujours 44% de puissance de départ après 55 jours. Cette pile a été conservée plusieurs mois, en stockage total, en changeant les solutions de stockage à intervalle régulier. Après 272 jours de stockage, la biopile permet toujours d'obtenir une puissance de l'ordre de  $9 \mu\text{W.h}^{-1}$  en imposant une résistance de 10 kOhm pendant 1 heure, ce qui représente environ 20% de la puissance maximale de la pile dans ces conditions.

Ces résultats, mis en corrélation avec la précédente étude, mettent en avant des difficultés à trouver des conditions idéales pour la stabilité à la fois de la bio-anode et de la biocathode. A court terme, la cathode étant limitante dans le dispositif, les décharges entraînent une baisse rapide de son potentiel. Le second effet au niveau de la cathode réside dans la hausse du pH local de la cathode lors de la réduction de  $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . De récentes études montrent également l'effet inhibiteur de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur la laccase<sup>33</sup>,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pouvant être produit non seulement par l'activité de la GOx mais également par une réduction partielle de  $\text{O}_2$  par la laccase<sup>34</sup>. Enfin, alors que le stockage des deux électrodes en pH neutre mène à une perte des performances de la cathode, le stockage en tampons séparés démontre les inconvénients de l'anode à plus long terme. Différentes hypothèses peuvent expliquer la diminution du potentiel de l'anode. L'hypothèse privilégiée est la surproduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lors d'un stockage prolongé en présence de substrat sans renouvellement de l'électrolyte. Cependant, malgré la baisse des performances de la

bioanode, la biopile complète est toujours fonctionnelle après 8 mois de stockage sans fonctionnement. Ce résultat souligne l'intérêt de ces nanostructures, comprenant une grande quantité d'enzymes permettant l'obtention de stabilité sur le long terme dans des conditions adéquates de fonctionnement et de stockage.

Dans l'idée de contourner les limitations dues aux décharges en continues, d'autres méthodes d'utilisation de la biopile peuvent être envisagées. Si la biopile présente des inconvénients en termes de stabilité dans le temps en stockage et décharges longues, la possibilité de décharger de manière répétée la pile sur de très courtes durées peut s'avérer être une alternative innovante. Il s'agit donc de d'effectuer des « pulses » très courts délivrant d'importantes puissances. Les nanostructures de composite enzyme/CNTs se prêtent particulièrement à cette technique de par la forte contribution capacitive de l'électrode lors d'une décharge à potentiel imposé. La biopile peut alors s'apparenter à un dispositif hybride, à mi-chemin entre une supercapacité et une pile à combustible. De cette manière, une biopile basée sur la connexion directe de GOx sur CNTs à l'anode et de connexion directe de laccase sur CNTs à la cathode ont permis d'effectuer 40000 décharges de 2 mW pendant 5 jours (avec 10 secondes de récupération entre des pulses de 10 ms). La puissance maximale de cette biopile en utilisation par pulse a été estimé à 16 mW. Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives quant à la façon de décharger des biopiles et donc de moduler leur utilisation dans le temps pour optimiser leur stabilité en vue de réelles applications *in vivo*.

#### II.4.3 Alimentation d'une DEL avec une biopile GOx-NQ/Lac

Les expériences menées précédemment ont démontré la possibilité d'obtenir de fortes puissances sur des temps relativement courts, de la milliseconde à l'heure, en conditions saturantes en substrats ou d'obtenir des puissances moindre mais reproductibles sur plusieurs dizaine de jours même en conditions restrictives.

L'alimentation d'une diode électroluminescente *via* l'utilisation d'un petit circuit optimisé a alors été envisagée afin de prouver la possibilité d'alimenter réellement un dispositif à faible demande énergétique (Figure II.26).

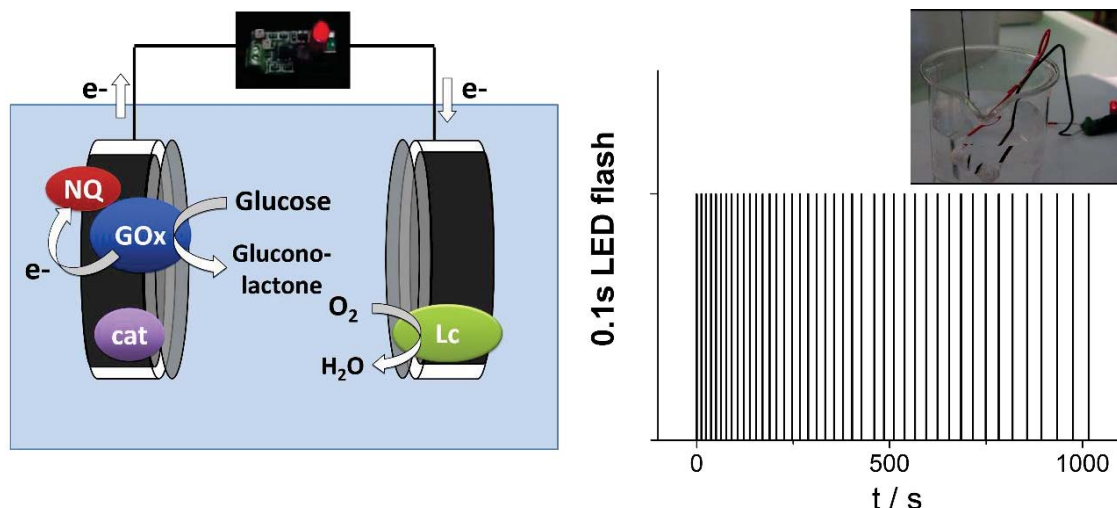


Figure II.26 : A gauche, schéma représentatif de la bio-pile GOx-NQ/Lac branchée au circuit d'alimentation de la diode. A droite, flash de 0,1 s de la diode alimentée par la pile pendant 15 minutes sous O<sub>2</sub> et en présence de 50 mM de glucose dans TP 0,2 M, pH 7 à RT, en insert cliché du montage en fonctionnement

L'utilisation du circuit permet, grâce à la présence d'un élévateur de tension d'autogérer la puissance délivrée par la pile. Grâce à ce circuit une capacité est alimentée directement grâce au courant produit par la biopile (Figure II.26). Une fois celle-ci complètement chargée elle se décharge afin d'allumer la diode durant 0,1 s.

La bio-pile, à 25°C, à pH7, 50mM de glucose et dans une solution saturée en O<sub>2</sub> permet d'allumer la DEL en moyenne toutes les 12 secondes pendant 20 minutes. Dans un second temps, la biopile continue d'alimenter le circuit et de faire clignoter la diode toute les 20 secondes pendant plus de 40 minutes. Un flash de DEL correspondant à une puissance de 1,13 mW, cela signifie que le biopile délivre une puissance de 0,1 mW pendant les 20 premières minutes et seulement 0,03 mW pendant les 40 dernière minutes de l'expérience. Les faibles valeurs de puissances recalculées peuvent s'expliquer par le fait que la pile est utilisée à température ambiante, la catalyse anodique est donc moindre. Des courants dits de fuite, occasionnés par le circuit, diminuent également les performances de la biopile.

Malgré des puissances plus faibles que lors des expériences précédentes, dans des conditions non optimales, cette expérience démontre la possibilité d'alimenter un dispositif à faible demande énergétique grâce à la biopile GOx-NQ/Lac de manière régulière.

## II.5 Conclusions

Dans la première partie du chapitre, l'élaboration d'une bio-anode nanostructurée MWCNTs/enzyme basée sur la connexion indirecte de la GOx a été décrite. Grâce à la NQ, possédant un potentiel rédox idéalement placé et une faible solubilité en milieu aqueux, la bio-

anode a permis d'obtenir de fortes densités de courant anodique de l'ordre de  $3 \text{ mA.cm}^{-2}$ . Dans cette même partie, l'utilisation de différents types de membranes a permis à la fois de limiter le départ en solution du médiateur rédox non-immobilisé, de conserver une bonne tenue mécanique de la bioélectrode et de faciliter la diffusion du substrat vers la protéine connectée. Cette partie a été conclue par une ouverture sur l'utilisation d'autres médiateurs rédox de type quinone dont les propriétés ont été évaluées à partir de bioélectrodes constituées cette fois-ci d'un composite DWCNTs/enzyme. De ces expériences, trois structures se sont avérées réellement intéressantes : la 2-méthyl-1,4-benzoquinone, la 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone et la 1,10-phenanthroline-5,6-dione. En effet ces médiateurs ont permis l'obtention de très fortes densités de courant anodique avec des potentiels d'abandon proche de la NQ respectivement :  $12,8 \text{ mA.cm}^{-2} / -0,18 \text{ V}$  ;  $1,5 \text{ mA.cm}^{-2} / -0,35 \text{ V}$  et  $9,5 \text{ mA.cm}^{-2} / -0,17 \text{ V}$ . Ces médiateurs ont également l'intérêt de pouvoir être modifiés chimiquement et donc de pouvoir s'intégrer à des structures immobilisables sur les CNTs répondant au problème de solubilisation éventuel du médiateur rédox. Dans cette optique, la 2-méthyl-1,4-benzoquinone, la 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone et la 1,10-phenanthroline-5,6-dione ont pu être modifiées chimiquement. L'incorporation de groupements rendant possible leur immobilisation sur CNTs a pu être réalisée. Cependant, malgré les potentiels rédox intéressants proposé par ces médiateurs fonctionnels, lorsque non modifiés et en solution, aucune de ces molécules n'a permis l'obtention d'un transfert électronique médiaté entre la GOx et les CNTs. La faible longueur et l'hydrophobicité de la chaîne (alkyl) séparant la sonde rédox de la surface peut expliquer la non connexion de la protéine. Dans ces cas précis, le médiateur n'est pas suffisamment solvaté pour pouvoir collecter les électrons au site actif de l'enzyme.

La seconde partie s'est focalisée sur la connexion directe d'enzymes à cuivre pour la fabrication de biocathode CNTs 3D. Les deux enzymes, Laccase et Tyrosinase ont été intégrées à la matrice MWCNTs et connectées avec succès donnant accès à des courants de catalyses de réduction de l'oxygène. Il s'agit là du premier exemple de connexion directe de la PPO pour la réduction de l'oxygène en eau.

Chaque système (Lac ou PPO) a démontré des avantages et des inconvénients. La Laccase qui donne les meilleures performances avec des  $I_{\text{max}}$  de l'ordre de  $3 \text{ mA.cm}^{-2}$  avec un potentiel à  $0,6 \text{ V}$  a le désavantage d'être bien moins active en condition physiologique. La PPO qui elle reste active même en condition physiologique donnent quant à elle des performances bien inférieures à celle de la Lac avec des  $I_{\text{max}}$  de seulement  $0,55 \text{ mA.cm}^{-2}$  à  $0,35 \text{ V}$ .

La troisième partie a consisté à combiner la bioanode caractérisée dans la partie 2) avec les deux bio-cathodes évaluées en partie 3). Les premiers résultats ont mis en avant l'effet prépondérant de la cathode (PPO ou Lac) sur les performances de la bio-pile. En effet, comme attendu les performances de la bio-pile GOx-NQ/Lac sont bien supérieures à celle de GOx-NQ/PPO avec un  $P_{\text{max}}$  de  $1,5 \text{ mW.cm}^{-2}$  contre  $0,14 \text{ mW.cm}^{-2}$ . Ces performances sont liées en



partie aux f.e.m de chaque biopile, 0,76 V contre 0,6 V, qui découlent elles même du potentiel cathodique, puisque le potentiel anodique étant fixé par une molécule rédox ne varie pas ou très peu (environ -0,2V).

La meilleure de ces biopiles, à savoir GOx-NQ/Lac a été étudiée en termes de stabilité. De ces expériences, la possibilité de décharger la pile pendant une longue durée (1h) a été prouvée et a permis d'obtenir des puissances de l'ordre de 0,56 mW.h<sup>-1</sup>. En stockage, la bio-pile s'est avérée moins stable lorsqu'elle était stockée dans des conditions d'utilisation (à pH 7 et en présence de glucose) en raison de l'instabilité de la bio-cathode dans les conditions neutres, conservant seulement 40% de puissance initiale après 7 jours. En revanche, lorsque les bio-électrodes sont stockées indépendamment dans des tampons adaptés à chaque protéine, la bio-pile peut être utilisée en décharge quotidienne pendant au moins 20 jours (82% de puissance initiale). De plus, cette même biopile, stockée pendant plus de 8 mois a aussi permis d'obtenir une puissance correspondant à 20% de la puissance maximale après 272 jours, soulignant l'intérêt de ces nanostructures dans ces conditions.

Enfin la possibilité d'alimenter un circuit électrique ainsi qu'un dispositif à faible demande énergétique a été démontré. La bio-pile a en effet permis l'alimentation d'une diode électroluminescente pendant 1h.

Les premières implantations des biopiles nanostructurées GOx-NQ/Lac sur CNTs ont été envisagées mais pour le moment aucune donnée n'a pu être enregistrée pour cause de problème technique lors des opérations d'implantations dans l'animal. Cette étape demeure particulièrement complexe.

D'autres limitations inhérentes au système d'électrode restent cependant à contourner. L'immobilisation du médiateur dans la nanostructure devrait notamment permettre de stabiliser d'autant plus les performances de la bioanode et la rendre parfaitement biocompatible.

Le choix des matériaux d'électrode peut également ajouter aux performances du système. La fabrication du composite par compression d'enzymes et CNTs pourrait être remplacée par d'autres matériaux nanostructurés permettant un rendement catalytique plus important en accord avec les quantités de biocatalyseurs intégrés aux bioélectrodes et une meilleure diffusion des substrats.

Par exemple, la fabrication d'électrodes flexibles pourrait permettre d'accroître considérablement les surfaces développées des électrodes et donc les performances catalytiques dans des volumes plus petits particulièrement intéressant pour l'implantable. L'utilisation de membranes biomimétiques trouverait également un intérêt particulier, ne laissant pénétrer que les substrats par exemple.

De plus, pour chaque type de dispositifs les paramètres à faire varier pour obtenir les performances optimales sont nombreux : quantité d'enzymes, quantité de médiateur, choix des membranes, matériaux d'électrode, etc.

1. M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 179–190.
2. T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, and M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 5129–5134.
3. S. Yoshino, T. Miyake, T. Yamada, K. Hata, and M. Nishizawa, *Adv. Energy Mater.*, 2013, **3**, 60–64.
4. M. Endo, H. Muramatsu, T. Hayashi, Y. A. Kim, M. Terrones, and M. S. Dresselhaus, *Nature*, 2005, **433**, 476–476.
5. M. Bourourou, K. Elouarzaki, M. Holzinger, C. Agnès, A. L. Goff, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M. Party, A. Maaref, and S. Cosnier, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 2885–2888.
6. K. MacVittie, J. Halámk, L. Halámková, M. Southcott, W. D. Jemison, R. Lobel, and E. Katz, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **6**, 81–86.
7. F. Gao, L. Viry, M. Maugey, P. Poulin, and N. Mano, *Nat. Commun.*, 2010, **1**, 2.
8. F. Giroud, C. Gondran, K. Gorgy, V. Vivier, and S. Cosnier, *Electrochimica Acta*, 2012, **85**, 278–282.
9. P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, and S. Cosnier, *PLoS ONE*, 2010, **5**, e10476.
10. A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, and S. Cosnier, *Nat. Commun.*, 2011, **2**, 370.
11. A. Zebda, S. Cosnier, J.-P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, and P. Cinquin, *Sci. Rep.*, 2013, **3**.
12. S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, and L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 2517–2554.
13. J. M. Goran, S. M. Mantilla, and K. J. Stevenson, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1571–1581.
14. P. Kavanagh and D. Leech, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 4859–4869.
15. T. P. Silverstein, *J. Chem. Educ.*, 2012, **89**, 1159–1167.
16. P. Alzari, N. Anicet, C. Bourdillon, J. Moiroux, and J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6788–6789.
17. N. J. Forrow, G. S. Sanghera, and S. J. Walters, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2002, 3187–3194.
18. M. Quan, D. Sanchez, M. F. Wasylkiw, and D. K. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12847–12856.
19. P. Fabry and C. Gondran, *Capteurs électrochimiques: Fonctionnement, utilisation, conception*, Ellipses, 2008.
20. Q. H. Gibson, B. E. P. Swoboda, and V. Massey, *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 3927–3934.
21. J. Wang, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 814–825.
22. C. A. Goss and H. D. Abruna, *Inorg Chem*, 1985, **24**, 4263–4267.
23. J. A. Cracknell, K. A. Vincent, and F. A. Armstrong, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2439–2461.
24. D. Leech, P. Kavanagh, and W. Schuhmann, *Electrochimica Acta*, 2012, **84**, 223–234.
25. M. Falk, Z. Blum, and S. Shleev, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 191–202.
26. A. I. Yaropolov, A. N. Kharybin, J. Emnéus, G. Marko-Varga, and L. Gorton, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1996, **40**, 49–57.
27. M. Rolff, J. Schottenheim, H. Decker, and F. Tuczek, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 4077–4098.
28. E. I. Solomon, U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2563–2606.
29. N. Makino, P. McMahon, H. S. Mason, and T. H. Moss, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 6062–6066.
30. H. W. Duckworth and J. E. Coleman, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 1613–1625.

31. J.-L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbé, and G. Reverdy, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **311**, 255–263.
32. E. I. Solomon, P. Chen, M. Metz, S.-K. Lee, and A. E. Palmer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 4570–4590.
33. R. D. Milton, F. Giroud, A. E. Thumser, S. D. Minter, and R. C. T. Slade, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 19371–19379.
34. P. Scodeller, R. Carballo, R. Szamocki, L. Levin, F. Forchiassin, and E. J. Calvo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 11132–11140.

# III. Fonctionnalisation de CNTs avec des catalyseurs moléculaires d'oxydation de NADH pour la connexion d'enzymes NAD<sup>+</sup> dépendantes

III. Fonctionnalisation de CNTs avec des catalyseurs moléculaires d'oxydation de NADH pour la connexion d'enzymes NAD <sup>+</sup> dépendantes.....	111
III.1 Introduction.....	113
III.1.1 Les déshydrogénases NAD <sup>+</sup> -dépendantes.....	113
III.1.2 Régénération du cofacteur NAD <sup>+</sup> .....	115
III.1.3 Immobilisation du catalyseur d'oxydation de NADH.....	118
III.2 Elaboration d'une bioanode à base de Glucose déshydrogénase : approche par capture de l'enzyme dans un composite CNTs / métallopolymer.....	119
III.2.1 Principe et caractérisation du monomère et du polymère.....	119
III.2.2 Oxydation électrocatalytique de NADH sur les électrodes de GC et MWCNTs fonctionnalisées par poly-[Ru <sup>II</sup> (PhQ) <sub>2</sub> (Bpy-pyrrole)].....	123
III.2.3 Propriétés d'encapsulation du métallopolymer.....	128
III.2.4 Bioanode MWCNTs/ poly-[Ru <sup>II</sup> (PhQ) <sub>2</sub> (Bpy-pyrrole)]-GDH.....	130
III.3 Elaboration d'une bioanode à base de Glucose déshydrogénase : approche supramoléculaire.....	133
III.3.1 Caractérisation du complexe RuQ-pyrène.....	133
III.3.2 Immobilisation sur MWCNTs et catalyse de NADH.....	134
III.3.3 Elaboration de la bioanode MWCNT/RuQ-pyrène/GDH.....	137
III.3.4 Comparaison des approches supramoléculaire et polymérique.....	141

III.3.5	Conception d'un biopile glucose-O <sub>2</sub> par combinaison de l'anode MWCNTs/RuQ-Pyrène-GDH avec une cathode de Bilirubin Oxidase .....	145
III.4	Conclusion du chapitre 3 .....	147

## III.1 Introduction

### III.1.1 Les déshydrogénases NAD<sup>+</sup>-dépendantes

Les déshydrogénases nécessitant la présence du cation Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD<sup>+</sup>), qui peut également être phosphorylé (NADP<sup>+</sup>) en tant que produit ou réactif, représentent une majorité des enzymes rédox actives. En effet, plus de 60% d'entre elles l'utilisent<sup>1</sup>. Ces déshydrogénases sont donc dites NAD<sup>+</sup>-dépendantes. Ces dernières sont impliquées dans de nombreux processus rédox biologiques et ont la particularité d'oxyder un large éventail de substrats biologiques comme : le glucose, l'éthanol, des aldéhydes, le lactate, le glutamate, etc. En outre, une de leurs particularités est notamment que O<sub>2</sub> n'intervient pas dans le processus d'oxydation du substrat ce qui en fait une classe de protéines particulièrement intéressante pour la bioélectrocatalyse<sup>2</sup>.

NAD(P)<sup>+</sup>, pour Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) est le cofacteur d'un grand nombre d'enzymes dites NAD(P)<sup>+</sup> dépendante. Sa forme réduite NAD(P)H est formée par l'enzyme consécutivement à une réaction d'oxydation du substrat de la protéine. La réduction de NAD<sup>+</sup> est un processus faisant intervenir 1 proton et 2 électrons<sup>3,4</sup> :

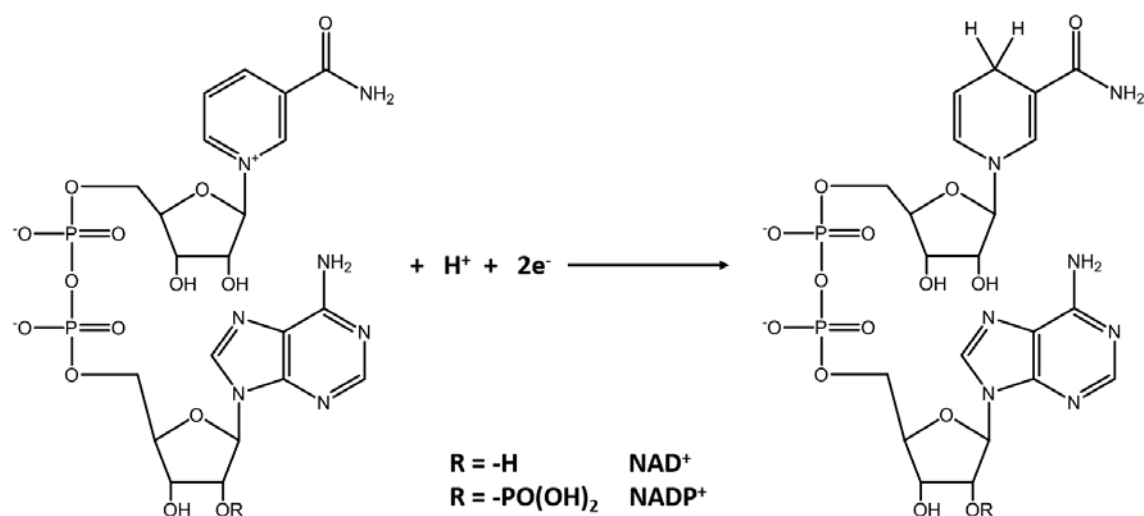


Figure III.1 : processus électrochimique de réduction de NAD<sup>+</sup> en NADH opéré par les déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendantes lors de l'oxydation d'un substrat

Plus simplement la réaction enzymatique d'oxydation du substrat peut s'écrire :



Où S et SH<sub>2</sub> sont les deux formes oxydées et réduites du substrat de l'enzyme.

Un autre aspect particulièrement intéressant est la possibilité de former des chaînes de réactions, ou « cascades enzymatiques » grâce à l'incorporation de plusieurs enzymes capables d'oxyder un substrat de manière totale donnant un rendement catalytique plus important. Une des premières expériences posant les bases de ces « cascades enzymatiques » a été décrite en 1997 par Palmore et al. où l'association d'une alcool déshydrogénase, aldéhyde déshydrogénase et formate déshydrogénase en solution a permis, sur électrode de graphite l'oxydation totale du méthanol en  $\text{CO}_2$  (Figure III.2)<sup>5</sup>. Dans ce cas précis,  $\text{NAD}^+$  en solution est réduit en NADH par les déshydrogénase lors de l'oxydation du méthanol, formaldéhyde et de l'acide formique. Ce NADH est alors oxydé pour régénérer  $\text{NAD}^+$  grâce au benzylviologen qui est ensuite réoxydé à l'électrode.

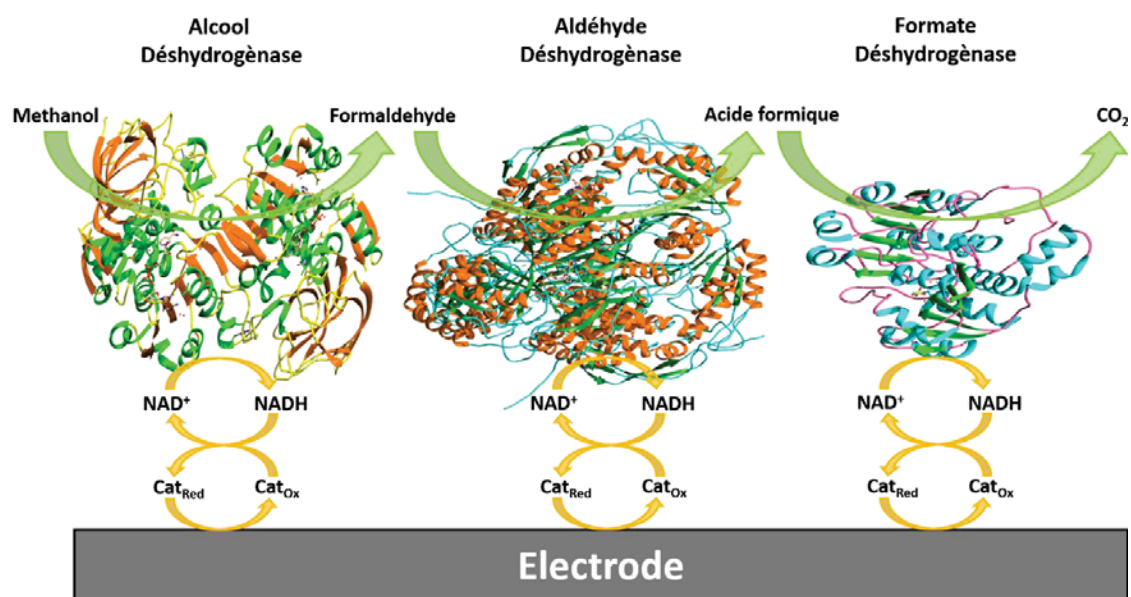


Figure III.2 : Schéma représentatif d'une « cascade enzymatique » à base de déshydrogénase  $\text{NAD}^+$ -dépendante pour l'oxydation totale du méthanol en  $\text{CO}_2$ <sup>5</sup>

Depuis, cette expérience a été réitérée avec des enzymes et catalyseurs moléculaire immobilisés avec succès sur des matrices de CNTs ou encore des fibres de carbones. En 2012, Kowalewska et al. ont décrit les oxydations successives de l'éthanol en éthanal puis l'éthanal en acide acétique<sup>6</sup>. Plus récemment encore, Kim et al. ont décrit l'oxydation totale du méthanol en  $\text{CO}_2$  en 3 étapes enzymatiques sur fibre de carbone<sup>7</sup>.

Ces avancées ouvrent de nouvelles opportunités en terme de développement de bioanodes enzymatiques à haut rendement catalytique, capable de récupérer le maximum d'électrons à partir d'un seul et même substrat d'origine<sup>8</sup>.

L'intérêt de l'utilisation des déshydrogénases  $\text{NAD}^+$ -dépendantes est grandissant car, comme indiqué précédemment, leur diversité en terme de substrat en fait une véritable boîte à outil en



bioélectrochimie notamment concernant l'élaboration de biocapteurs à applications diverses et, de plus en plus depuis quelques années, dans la conception de bioanodes pour les biopiles enzymatiques.

Depuis l'utilisation des CNTs dans la conception de biopiles, de nombreuses déshydrogénases  $\text{NAD}^+$ -dépendantes ont pu être connectées. Ces dernières années en particulier, des biopiles produisant de l'énergie à partir du glucose<sup>9</sup>, de l'éthanol<sup>10</sup> et même du L-lactate<sup>11</sup> ont été élaborées avec succès.

Un des rôles important du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  dans le milieu biologique est son implication dans le transport d'électrons permettant la réduction de  $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . Dans ce cycle réactionnel  $\text{NADH}$  est de nouveau oxydé en  $\text{NAD}^+$  au site actif de protéines rédox contenant des cofacteurs de type Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) qui est finalement oxydé de  $\text{FADH}_2$  à  $\text{FAD}$  grâce à  $\text{O}_2$ <sup>2</sup>.

### III.1.2 Régénération du cofacteur $\text{NAD}^+$

Un des défis à relever afin de pouvoir tirer avantage de la diversité des réactions de biocatalyse opérées par ces déshydrogénases en bioélectrocatalyse est celui de la régénération du cofacteur  $\text{NAD}^+$ .

Une des particularités de  $\text{NAD}^+$  est qu'il n'est pas « lié » physiquement à la poche protéique, il joue donc le rôle de médiateur rédox biologique<sup>12</sup>. Cependant, si le processus d'oxydation mettant en jeu les 2 électrons et 1 protons à lieu au potentiel thermodynamique de -0,56 V (Vs  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ )<sup>13</sup>, la réaction d'oxydation de  $\text{NADH}$  en  $\text{NAD}^+$  sur électrode de carbone vitreux s'effectue avec une surtension proche de 1 V<sup>14</sup>. De plus, l'oxydation directe de  $\text{NADH}$  à l'électrode a pour effet de passiver la surface de cette dernière rendant impossible son utilisation<sup>1,15,16</sup>.

Afin de contourner ce problème, de nombreuses études conduites depuis une trentaine d'année ont démontrées qu'il était possible de régénérer catalytiquement  $\text{NAD}^+$  grâce à la modification de la surface de l'électrode à l'aide de différents matériaux (CNTs, graphène, nanoparticules) ou encore de catalyseurs et biocatalyseurs moléculaires. Ces modifications peuvent être enzymatiques ou moléculaires et l'oxydation de  $\text{NADH}$  peut donc être d'ordre bioélectrocatalytique<sup>17</sup> ou électrocatalytique<sup>18</sup>.

D'autres méthodes, autres que l'utilisation de catalyseurs moléculaires ont été employées par le passé. Des études décrivent notamment l'incorporation de nanoparticules<sup>19</sup> ou encore l'utilisation de nanomatériaux carbonés, comme les CNTs ou encore les sphères de carbone<sup>20</sup>. Plus précisément concernant les CNTs, Musameh et al. ont fait état en 2002 de la possibilité de

diminuer la surtension d'oxydation de NADH à l'électrode jusqu'à -0,05 V grâce à la modification d'électrode avec des CNTs<sup>21</sup>. Plus récemment encore, des études ont également démontrées que l'orientation des CNTs et leur état d'oxydation pouvaient aussi jouer un rôle positif dans la catalyse d'oxydation du cofacteur<sup>22,23</sup>. Cependant l'efficacité catalytique obtenue grâce à ces seuls nanomatériaux n'atteint pas les performances délivrées par l'intermédiaire d'un catalyseur moléculaire de NADH.

Les systèmes d'électrode les plus couramment utilisés sont constitués d'une entité capable de catalyser l'oxydation de NADH. Cette catalyse peut être effectuée par une enzyme ou par une espèce rédox (Figure III.3). Des cas de système utilisant des protéines rédox ont déjà été décrit avec l'utilisation par exemple de la Diaphorase<sup>5,24</sup> ou encore de Flavine Reductase<sup>25</sup>. L'un des résultats les plus marquant de ces dernières années a été l'élaboration d'une biopile Glucose-O<sub>2</sub> par l'intégration à l'anode de la glucose déshydrogénase (GDH), oxydant le glucose, la diaphorase (DPase), régénérant NAD<sup>+</sup> et la 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (ou vitamine VK3) en tant que médiateur rédox de la diaphorase. Cette pile développée par Sakai et al. a permis de délivrer une puissance maximale de 1,45 mW.cm<sup>-2</sup> avec une contribution anodique de l'ordre de 4,1 mA.cm<sup>-2</sup><sup>9</sup>. Dans les deux cas, la protéine effectuant l'oxydation doit être régénérée et nécessite donc la présence d'un médiateur rédox qui sera lui-même oxydé dans un second temps à l'électrode. Ces systèmes sont plus « complexes » puisqu'ils font intervenir 3 processus rédox successifs.

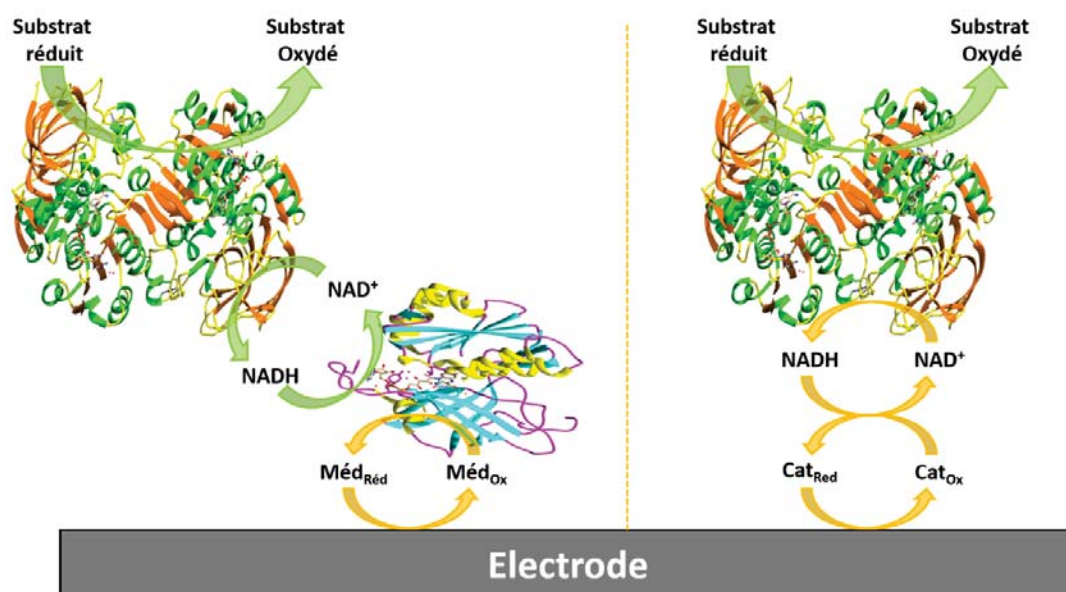


Figure III.3 : Schéma de la connexion d'une déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante avec régénération de NAD<sup>+</sup> par voie enzymatique et médiation (à gauche) et régénération du cofacteur par un catalyseur moléculaire (à droite)

La deuxième méthode consiste à utiliser un catalyseur moléculaire d'oxydation de NADH. Elle a l'avantage de réduire la chaîne de transport d'électrons puisque seuls deux processus rédox sont mis en jeu. Depuis plusieurs années, un grand nombre de catalyseurs aux structures diverses ont été utilisés pour régénérer  $\text{NAD}^+$  dans le cycle catalytique engagé<sup>26</sup>. Les azines en particulier ont été abondamment étudiées<sup>13</sup>. Basées sur ce squelette il existe un grand nombre de structures avec des propriétés rédox variant en fonction de la nature de l'atome situé en *para* de l'azote et des substituants présents sur les cycles aromatiques (Figure III.4). Les phenoxazines (X=O) et les phenothiazine (X=S) sont connus pour avoir les meilleures activités catalytiques<sup>27</sup>. Il est intéressant de noter que le site actif de la diaphorase est constitué d'une riboflavine qui est un dérivé d'azine.

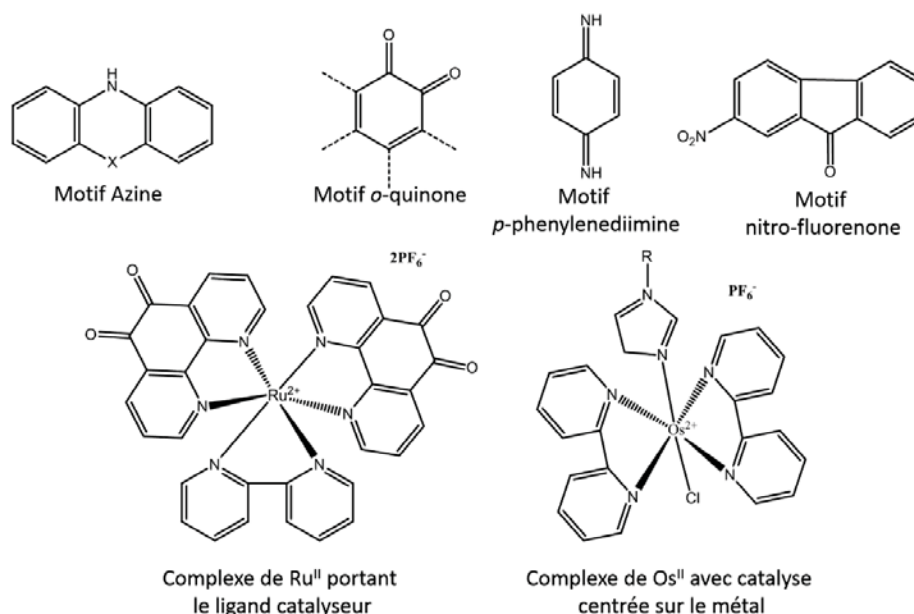


Figure III.4 : Structures de différents types de catalyseurs moléculaires permettant la régénération de  $\text{NAD}^+$

Toujours afin de régénérer  $\text{NAD}^+$ , les quinones, et plus précisément les *o*-quinones se sont avérées être d'excellents catalyseurs. L'une des premières preuves de catalyse a été apportée par Degrand et al.<sup>28</sup>. La catalyse du cofacteur est effectuée par un polymère constitué de dopamine, une *o*-quinone. Depuis, de nombreuses stratégies mises en place pour l'oxydation de NADH sont basées sur des catalyseurs porteurs de ce motif<sup>29–32</sup>. Une autre classe de molécule oxydant NADH, les nitrofluorenones, a été décrite en 1999 par Mano et Kuhn<sup>33</sup>. Cette classe de molécule est décrite comme adaptée à la catalyse d'oxydation de NADH de par leur processus rédox à  $2\text{H}^+$  et  $2\text{e}^-$  similaire à celui des quinones. Par la suite, ils ont également décrit l'amélioration de la catalyse induite par la présence de cation, tel que  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>34</sup>. Ce phénomène avait déjà été décrit par Katz et al. avec une *o*-quinone, pyrroloquinoline quinone (PQQ) en 1994 et l'hypothèse de la formation d'un complexe  $\text{PQQ-Ca}^{2+}$  ayant une affinité supérieure à PQQ seul vis-à-vis de NADH avait alors été émise<sup>35</sup>. Les *p*-phenylenediimines ont également

été employées comme catalyseurs d'oxydation de NADH, là encore avec un processus électrocatalytique semblable à celui observé avec les quinones<sup>2</sup>.

Un certain nombre de complexes de coordination a également démontré une activité catalytique vis-à-vis de l'oxydation de NADH. Des exemples existent notamment dans la littérature avec des complexes comprenant des cations  $\text{Co}^{2+}$  ou encore  $\text{Os}^{2+}$ <sup>36,37</sup>. Des ligands coordonnant ayant une activité rédox ont également été utilisés pour l'oxydation de NADH<sup>29</sup>. La 1,10-phenanthroline-5,6-dione (Phendion) a déjà été décrite dans plusieurs études comme étant un excellent catalyseur d'oxydation de NADH<sup>32</sup>. La catalyse de ce ligand a également été observé lorsqu'il est coordonné à un cation comme l'osmium<sup>38</sup> ou le ruthénium<sup>29</sup>.

### III.1.3 Immobilisation du catalyseur d'oxydation de NADH

Dans l'optique de régénérer efficacement  $\text{NAD}^+$  à l'électrode, nous avons choisi d'étudier l'immobilisation de ce type de complexes sur électrodes de CNTs. En effet, ces complexes possèdent d'excellentes propriétés d'électrocatalyse de NADH à bas potentiel, de l'ordre de -0.1V, et la possibilité d'introduire des groupements fonctionnels au niveau des ligands bipyridines du centre métallique. Les avantages des CNTs en tant que matériaux d'électrode carboné ont déjà été décrits en introduction générale<sup>39</sup> de même que leur utilisation pour la conception de biopiles<sup>40</sup>. Les CNTs ont montré depuis plusieurs années d'excellentes propriétés électrochimiques vis-à-vis de l'immobilisation d'électrocatalyseurs moléculaires de réduction des protons<sup>41,42</sup>, du  $\text{CO}_2$ <sup>43</sup> ou encore du dioxygène<sup>44,45</sup>. Plusieurs méthodes basées sur la fonctionnalisation covalente ou non-covalente ont indéniablement prouvé l'intérêt d'utiliser les CNTs pour l'électrocatalyse. En particulier, les interactions pi-pi entre des molécules polyaromatiques tels que le pyrène ont permis de développer une méthode simple et supramoléculaire d'immobilisation de molécules rédox sur la paroi des CNTs<sup>43,46</sup>. Dans le cas de catalyseurs organiques d'oxydation de NADH, la structure conjuguée de ces espèces permet les interactions de  $\pi$ -stacking entre les cycles aromatiques des CNTs et ceux du catalyseur. De cette manière un certain nombre de médiateurs tels que des azines ou des *o*-quinones ont été immobilisés et ont permis la régénération de  $\text{NAD}^{+32,47,48}$ .

La formation de matériaux composites à base de CNTs et de polymères conjugués tels que la polyaniline, le polypyrrole, le polythiophène ou encore le polyphénylène à la surface des CNTs a fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années<sup>49</sup>. Certains catalyseurs à structures particulières, comme certaines azines, ont la particularité de pouvoir être polymérisées à la surface des CNTs et de former *in fine* un nanomatériau particulièrement efficace pour la régénération de  $\text{NAD}^+$ . C'est le cas du bleu de méthylène ou encore du vert de méthylène<sup>48,50-52</sup>. Ces composites sont particulièrement intéressants dans l'optique du développement de

bioanodes à enzyme  $\text{NAD}^+$ -dépendante. Un des aspects essentiels dans l'élaboration d'une bioélectrode composée de l'enzyme déshydrogénase et du catalyseur de régénération de cofacteur est de s'assurer de l'immobilisation des deux entités sur la surface afin de n'avoir plus qu'une seule espèce en solution :  $\text{NAD}^+$ . Le problème majeur rencontré dans la plupart de ces techniques de fonctionnalisation réside dans le fait qu'il est bien souvent nécessaire de passer par une seconde étape pour immobiliser la protéine sur la surface de l'électrode. La réticulation par agent de couplage ou encore la capture de l'enzyme au sein de polymères amphiphiles sont ainsi fréquemment envisagés mais se font en général au détriment des performances de la bioélectrode.

Dans ce chapitre, nous avons étudié la modification de complexes de ruthénium pour leur immobilisation non-covalente sur CNTs. Nous nous sommes focalisés sur des méthodes non-covalentes qui sont non-destructrices du système  $\pi$  étendus de la paroi des CNTs et qui permettent un contrôle sur les quantités de catalyseur et d'enzyme déposées. Ces modifications ont pour objectif l'immobilisation simple et efficace, non seulement des complexes de  $\text{Ru(II)}$  mais également des GDH. Notre choix s'est porté sur l'utilisation de groupements pyrroles et pyrène pour fonctionnaliser le catalyseur. D'une part, l'utilisation de monomères pyrroles fonctionnalisés a pour objectif l'immobilisation des enzymes dans un polymère amphiphile électrogénéré. D'autre part, les dérivés pyrène fonctionnalisés permettent la double fonctionnalisation flexible des électrodes de CNTs par le catalyseur et par un site d'ancrage de l'enzyme.

## III.2 Elaboration d'une bioanode à base de Glucose déshydrogénase : approche par capture de l'enzyme dans un composite CNTs / métallopolymère

### III.2.1 Principe et caractérisation du monomère et du polymère

Dans la même optique d'immobiliser l'enzyme et le catalyseur sur la surface de l'électrode de CNTs, la synthèse d'un complexe de coordination comprenant le motif *o*-quinone et une fonction d'ancrage a été envisagée.

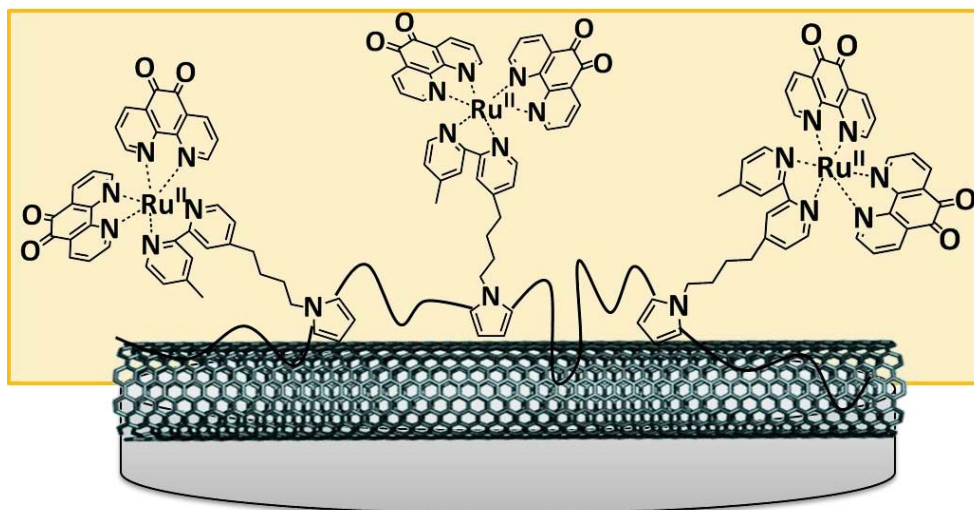


Figure III.5 : Représentation schématique du poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] électrogénéré sur CNTs

Le choix s'est porté sur un cation de Ru<sup>2+</sup>, étant coordonné par 2 ligands 1,10-phenanthroline-5,6-dione et une bipyridine (Bpy) portant un pyrrole électropolymérisable sur électrode. Son électropolymérisation a été envisagée sur carbone vitreux ainsi que sur électrode modifiée de CNTs (Figure III.5).

La Phendion est disponible commercialement et la synthèse du ligand Bpy a été précédemment décrite<sup>53</sup>. La synthèse du complexe [Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> a été décrite dans le chapitre 2.

Il a également été caractérisé en solution dans l'acétonitrile. Le monomère présente un système rédox réversible à E<sub>1/2</sub> = 1,05 V qui correspond au système réversible Ru<sup>II/III</sup>. En réduction, deux systèmes de pics réversibles apparaissent à E<sub>1/2</sub> = -0,51 et E<sub>1/2</sub> = -1,39V attribués aux deux réductions successives à 1e<sup>-</sup> des ligands Phendion en milieu aprotique comme observé précédemment dans la littérature<sup>29</sup>. Le dernier système réversible observé à E<sub>1/2</sub> = -1,99 V correspond à la réduction du ligand Bpy.

Grâce à la présence de l'entité pyrrole, le ligand peut également être polymérisé sur la surface de l'électrode. La polymérisation du complexe a été étudiée sur carbone vitreux et, afin de développer par la suite un composite CNT-métallopolymère, sur films de nanotubes de carbone multiparois (MWCNTs) déposé à la surface d'une électrode de carbone vitreux.

Ces films de MWCNTs ont été préparés selon la procédure décrite par Wu et al.<sup>54</sup>. Cette technique permet de réaliser des films d'épaisseurs contrôlables de manière reproductible. Cette technique consiste dans un premier temps à réaliser une dispersion d'une faible quantité de MWCNTs dans un large volume d'eau distillée dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes. La dispersion obtenue est alors décantée pendant 12h et le surnageant est alors prélevé puis filtré sur membrane de cellulose. Le choix du volume prélevé détermine l'épaisseur du film obtenu après filtration. Le film obtenu peut alors être déposé sur disque de carbone vitreux et la



membrane de cellulose dissoute par lavage successif à l'acétone. Au cours de cette étude l'épaisseur des films déposés est de l'ordre de 5  $\mu\text{m}$ .

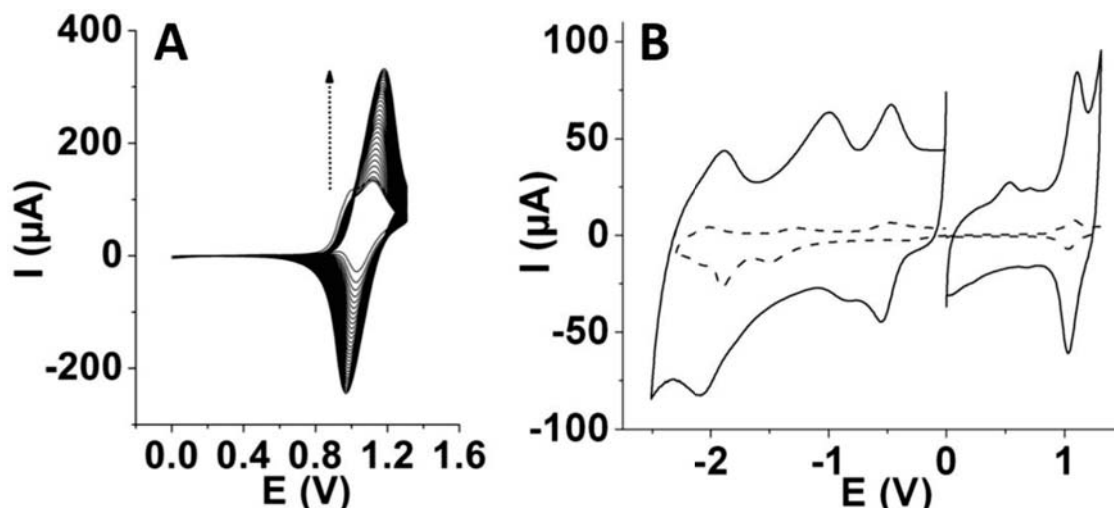


Figure III.6 : A) Electropolymérisation de  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{PhQ})_2(\text{Bpy-pyrrole})]$  électrode modifiée de MWCNTs à 1mM dans MeCN 0,1 M TBAP par cyclage en potentiel (25 cycles) de 0 à 1,3 V vs Ag/AgNO<sub>3</sub> ( $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ ) C) Caractérisation du métallopolymère dans MeCN 0,1 M TBAP sur électrode de carbone vitreux (pointillés) et sur MWCNTs (trait plein) après électropolymérisation du monomère réalisé entre 0 et 0,8 V (10 scans à  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ ).

A la suite de la formation du film de MWCNTs sur l'électrode, l'étape suivante consiste à fonctionnaliser le dépôt par électropolymérisation du monomère  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{PhQ})_2(\text{Bpy-pyrrole})]$  à 1 mM dans TBAP 0,1 M. L'électropolymérisation sur carbone vitreux et sur film de MWCNTs est réalisée entre 0 et 1,3 V vs Ag/AgNO<sub>3</sub>, au-delà de l'oxydation du pyrrole. L'augmentation du signal rédox correspondant au couple  $\text{Ru}^{\text{II/III}}$  illustre l'électrodéposition du polymère formé à l'électrode au fur et à mesure des scans (Figure III.6A).

Cependant, afin d'éviter la suroxydation du polypyrrole formé, rendant le film résistif, l'électropolymérisation a été effectuée de 0 à 0,9 V vs Ag/AgNO<sub>3</sub>, se limitant au pied de la vague d'oxydation irréversible du pyrrole. Le métallopolymère électrogénéré a ensuite été caractérisé sur carbone vitreux et MWCNTs (Figure III.6B).

Le poly- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{PhQ})_2(\text{Bpy-pyrrole})]$  présente un système de pic réversible à  $E_{1/2} = 1,05 \text{ V}$  correspondant au couple  $\text{Ru}^{\text{II/III}}$ . Le faible signal observé à 0,5 V peut être attribué à l'électroactivité du polypyrrole. Le système réversible à  $E_{1/2} = -0,51 \text{ V}$  et celui peu réversible à  $E_{1/2} = -1,39 \text{ V}$  correspondent aux deux réductions successives du ligand phénanthroline-quinone. Un dernier système, observé à  $E_{1/2} = -1,99 \text{ V}$  est dû à la réduction du ligand Bpy.

Les pics observés à -1,90 V et 0,53 V et particulièrement intenses sur carbone vitreux sont attribués au phénomène de « charge-trapping » déjà observé dans le cas de métallopolymères électrogénérés<sup>55</sup>. Le polymère a également pu être électrogénéré par méthode chronoampérométrie (potentiel imposé) à 0,8 V. En faisant le rapport de la charge délivrée durant cette méthode et de la charge calculée par intégration des signaux rédox (du polypyrrole



et du Ru<sup>II/III</sup>) obtenue en voltaampérométrie cyclique, les rendements de polymérisation sur carbone vitreux et sur MWCNTs ont pu être déterminés. Le rendement de polymérisation pour l'électrode de MWCNTs est de 10% contre 2% pour le carbone vitreux. La concentration de surface en poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] est bien plus importante sur MWCNTs (80 nmol.cm<sup>-2</sup>) comparé au carbone vitreux (7,2 nmol.cm<sup>-2</sup>). Cette augmentation est liée à une bien meilleure adsorption du monomère et du polymère sur CNTs facilitant l'électrodéposition. La concentration maximale de surface du complexe électropolymérisé a été calculée par intégration du pic d'oxydation Ru<sup>II/III</sup> après 50 scans de polymérisation entre 0 et 0,9 V, ce qui a permis d'estimer le nombre d'équivalents en monocouches de complexe sur les deux types d'électrodes. Considérant qu'une monocouche compacte de complexe métallique trisbipyridine équivaut à 8.10<sup>-11</sup> mol.cm<sup>-2</sup> <sup>56</sup> la quantité de complexe immobilisé sur GC et MWCNTs correspond à environ 90 et 1000 couches respectivement, mettant en avant l'efficacité du processus de polymérisation sur l'électrode de MWCNTs et leur grande surface spécifique.

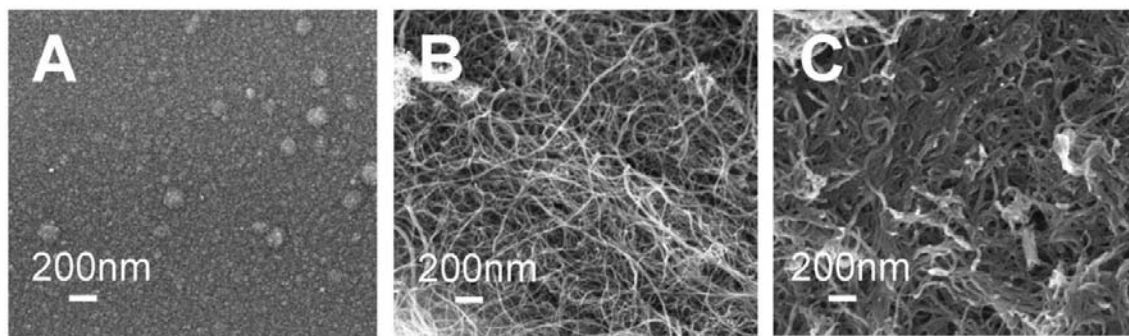


Figure III.7 : Clichés MEB de A) électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] B) électrode de MWCNTs seuls C) électrode de MWCNTs fonctionnalisés par poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]

La Figure III.7 montre des clichés obtenus par microscopie électronique à balayage (MEB) pour des électrodes de GC et de MWCNTs fonctionnalisés avec le film de poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]. Sur GC, le film de polypyrrole possède une surface rugueuse caractéristique de l'électropolymérisation de pyrrole sur électrode plane. En comparant des électrodes de MWCNTs avant et après électropolymérisation, on observe que les parois des MWCNTs sont recouvertes de manière homogène par une fine couche de métalpolymère de l'ordre de 3 à 5 nm. Ces clichés mettent en avant la très grande surface spécifique du composite poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/MWCNTs et corroborent les grandes surfaces de recouvrement estimées précédemment.

### III.2.2 Oxydation électrocatalytique de NADH sur les électrodes de GC et MWCNTs fonctionnalisées par poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]

Grâce à la présence des ligands phénanthrolinequinone, la capacité du métallopolymère à électrocatalyser l'oxydation de NADH a été évaluée. Les électrodes modifiées de GC et MWCNTs ont été étudiées par CV entre -0,2 et 0,2 V dans la gamme d'électroactivité du ligand phendion dans du tampon phosphate 0,2 M à pH 7 (Figure III.8 A et B).

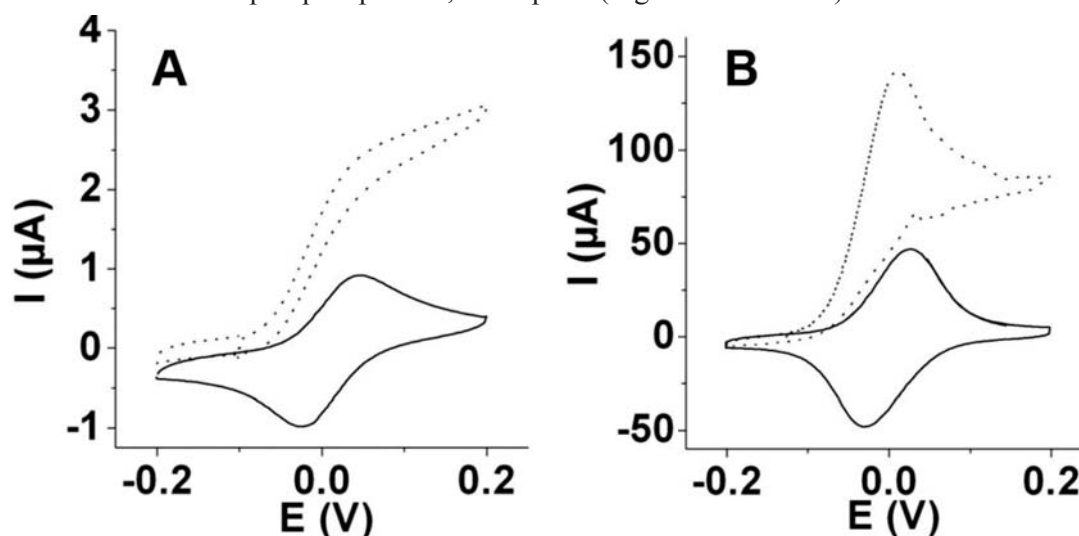


Figure III.8 : A) CV du poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] sur carbone vitreux ( $\Gamma=0,4 \text{ nmol.cm}^{-2}$ ) en absence (trait plein) et présence (pointillés) de 10 mM de NADH dans TP 0,2 M pH7 ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) B) CV du poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] sur MWCNTs ( $\Gamma=14 \text{ nmol.cm}^{-2}$ ) en présence (pointillés) et absence (trait plein) de 10 mM de NADH dans TP 0,2 M pH7 ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) (la surface géométrique des électrodes est de  $0,07 \text{ cm}^2$ )

A la fois sur les électrodes de GC et de MWCNTs le couple rédox biélectronique du ligand phendion est observé à  $E_{1/2} = -0,01 \text{ V}$  à pH 7. L'intensité bien supérieure du pic sur MWCNTs par rapport à l'électrode de GC confirme l'immobilisation d'une plus grande quantité de métallopolymère comme observé précédemment en milieu organique. La valeur de  $E_{1/2}$  subi un décalage négatif linéaire avec l'augmentation du pH de la solution avec une pente de 47 mV/pH très proche de la valeur théorique pour un système rédox à  $2\text{H}^+$  et  $2\text{e}^-$  de 59 mV à 25°C.

En présence de 10 mM de NADH, l'augmentation du pic anodique confirme les propriétés d'électrocatalyse du poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] à la fois sur les électrodes de GC et de MWCNTs. Les courants électrocatalytiques anodiques d'oxydation de NADH obtenus pour les électrodes de GC et MWCNTs à 0,2 V sont respectivement de  $0,04 \text{ mA.cm}^{-2}$  et  $1,1 \text{ mA.cm}^{-2}$ , ce qui représente une augmentation de facteur 30 pour l'électrode de MWCNTs.

Afin de caractériser la perméabilité du métallopolymère électrogénéré sur GC et MWCNTs, le comportement électrochimique de  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  en tant que sonde de perméabilité a été observé à la surface des électrodes modifiées (Figure III.9).

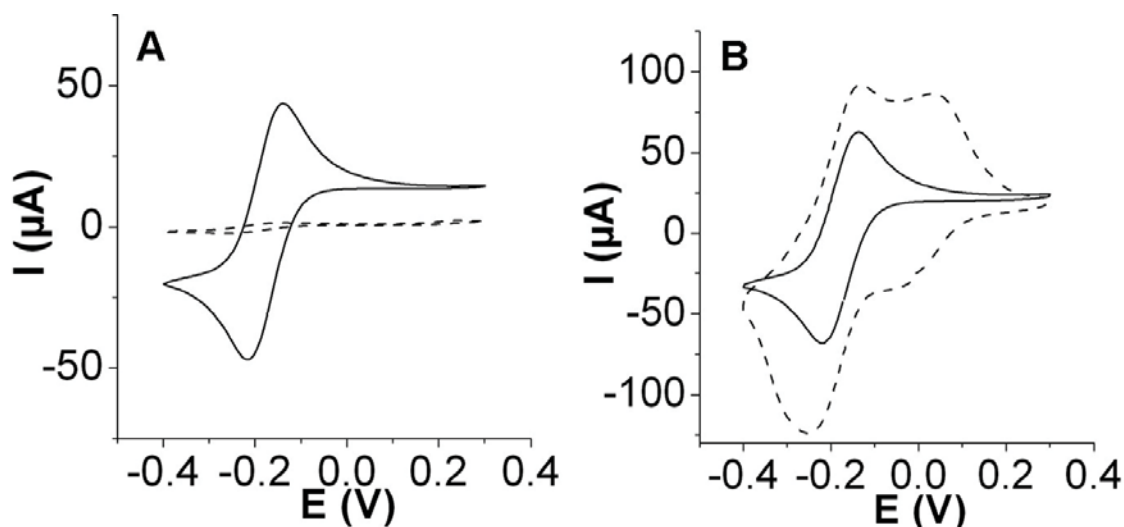


Figure III.9 : CV avant (trait plein) et après (pointillés) fonctionnalisation avec le poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] dans KCl 0,1 M en présence de 5 mM de Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup> pour A) une électrode de GC avec  $\Gamma=0,4 \text{ nmol.cm}^{-2}$  ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) et B) une électrode de MWCNTs avec  $\Gamma=14 \text{ nmol.cm}^{-2}$  ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) (la surface géométrique des électrodes :  $0,07 \text{ cm}^2$ )

Les valeurs d'intensités des pics observés pour le couple Ru<sup>II/III</sup> sur carbone vitreux et sur MWCNTs avant fonctionnalisation par le film de poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] sont très proches alors que la surface réelle de l'électrode de MWCNTs est bien supérieure au carbone vitreux. Ceci peut s'expliquer par le caractère hydrophobe du film de MWCNTs qui ne s'hydrate pas totalement et ne permet donc pas la diffusion de la sonde rédox à l'intérieur du film. Suite à l'électrogénération du métallopolymère, dans le cas de l'électrode de GC, l'électroactivité de la sonde disparaît quasi totalement après recouvrement de la surface par le métallopolymère. A l'inverse, dans le cas de l'électrode de MWCNTs les vagues du système réversible de la sonde ne sont pas modifiées par la présence du polymère à la surface des MWCNTs. Ceci souligne en particulier que la croissance du film sur MWCNTs n'a pas d'effet significatif sur la diffusion au sein de la matrice de CNTs, au contraire de l'électrode de GC. Pour confirmer ces résultats et pour avoir de plus amples informations concernant l'électrocatalyse d'oxydation de NADH par le film de poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] sur MWCNTs, les électrodes de GC et de MWCNTs ont été fonctionnalisées par différentes quantités de métallopolymère. Les valeurs de courant catalytiques à 0,2 V pour chaque quantité de métallopolymère déposé sont présentées sur les Figure III.10 A et B.

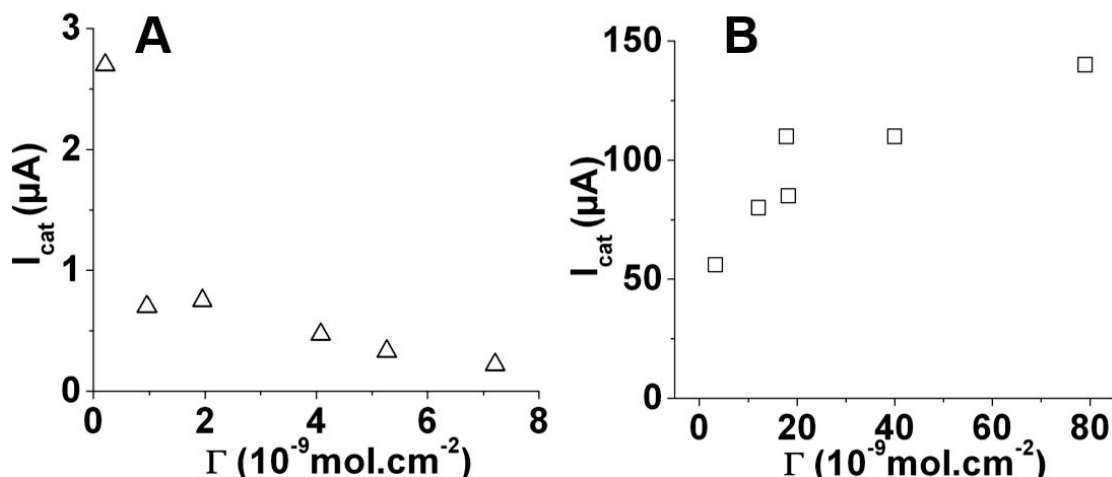


Figure III.10 : A) Valeurs des courants catalytiques d'oxydation de NADH obtenu sur carbone vitreux en fonction de la quantité de poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]électrodéposé en présence de 10 mM de NADH dans TP 0,2 M pH7 D) Valeurs des courants catalytiques d'oxydation de NADH obtenu sur MWCNTs en fonction de la quantité de poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]électrodéposé en présence de 10 mM de NADH dans TP 0,2 M pH7 ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Pour les électrodes de GC, la déposition d'une trop grande quantité de poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] a pour effet de diminuer drastiquement le courant catalytique. Ceci peut s'expliquer par la rapide formation d'un épais film de polymère ayant pour effet de bloquer la diffusion des espèces et donc de NADH. Au contraire, sur électrode de MWCNTs, le courant catalytique obtenu croît avec la quantité de complexe électropolymérisé jusqu'à déposer une importante quantité de catalyseur d'environ 80 nm.cm<sup>-2</sup>.

Afin d'en savoir plus sur les propriétés catalytiques du métallopolymère déposé sur MWCNTs, des mesures de cinétique d'oxydation de NADH ont été réalisées à l'électrode tournante (ET). L'équation simple de Koutecky-Levich permet de remonter directement à la contribution de la diffusion de l'espèce (ici NADH) en courant  $I_{\text{lim}}$  en fonction de  $1/\omega^{1/2}$ :

$$\frac{1}{I_{\text{lim}}} = \frac{1}{0,62nFAD_{\text{NADH}}^{2/3}\omega^{-1/2}\nu^{-1/6}C_{\text{NADH}}}$$

Où A représente la surface de l'électrode tournante (cm<sup>2</sup>), D le coefficient de diffusion de NADH (cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>),  $\nu$  la viscosité cinématique (cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), C la concentration en NADH (mol.cm<sup>-3</sup>) et  $\omega$  la vitesse angulaire de rotation de l'électrode tournante (rad.s<sup>-1</sup>). La surface A prise en compte la surface géométrique de l'électrode. La présence d'un film aux propriétés propriétés rédox et catalytiques vis-à-vis de l'oxydation de NADH permet de rajouter un terme à cette équation caractérisant la contribution de l'électrocatalyse du film en  $I_{\text{lim}}$  total, comme cela a été décrit par Abruna et al. <sup>57</sup> :

$$\frac{1}{I_{lim}} = \frac{1}{0,62nFAD_{NADH}^{2/3}\omega^{-1/2}\nu^{-1/6}C_{NADH}} + \frac{1}{nFAk\Gamma_{Ru}C_{NADH}}$$

Avec  $k$  la constante de vitesse catalytique d'oxydation de NADH du complexe ( $L.mol^{-1}.s^{-1}$ ) et  $\Gamma_{Ru}$  la concentration surfacique en métallopolymère ( $mol.cm^{-2}$ ). Cette équation permet donc de remonter à la constante  $k$  correspondant à l'activité catalytique du complexe électropolymérisé. Dans un premier temps, elle peut être déterminée pour un film d'épaisseur fixée en faisant varier la vitesse de rotation de l'électrode. Pour cette expérience, un film de  $25\text{ nmol}.cm^{-2}$  a été électrogénéré par CV entre 0 et 0,9 V comme précédemment. Pour cette électrode, la catalyse de NADH a été suivie par polarisation de -0,2 à 0,2 V Vs SCE en présence de 1 mM de NADH et en faisant varier la vitesse de rotation de l'électrode de 0 à 5000 tour par minutes (Figure III.11).

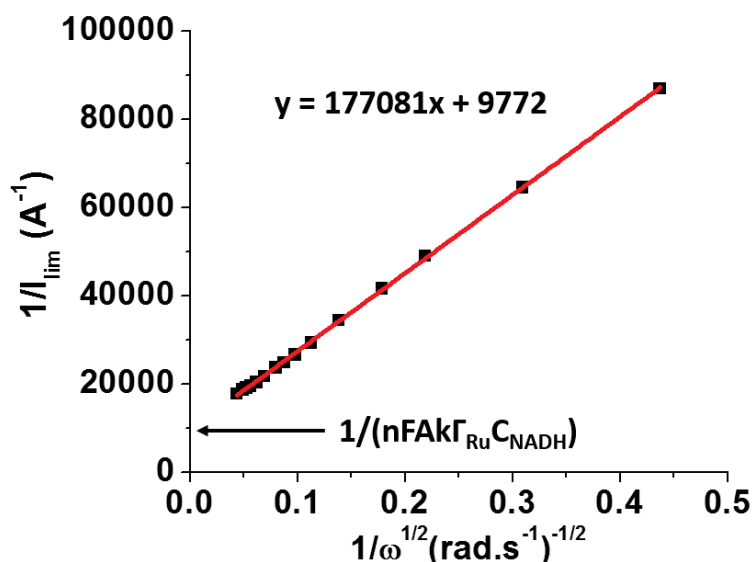


Figure III.11 : Courbe de  $1/I_{lim} = f(1/\omega^{1/2})$ , les valeurs expérimentales sont représentées par les carrés noirs. La courbe rouge représente la courbe de tendance

L'équation de Koutecky-Levich a donc été appliquée à différentes vitesses de rotation de l'électrode pour une concentration surfacique en polymère fixe et une concentration en NADH fixée également. D'après l'équation, l'évolution de la courbe  $1/I_{lim}$  en fonction de  $1/\omega^{1/2}$  est linéaire. L'ordonnée à l'origine de la droite, égale à  $1/(nFAk\Gamma_{Ru}C_{NADH})$ , donne donc accès à la constante  $k = 3.03.10^2\text{ L}.mol^{-1}.s^{-1}$  à toutes les vitesses de rotations d'électrodes appliquées.

Dans le but de connaître l'influence de l'épaisseur du film de poly-[ $Ru^{II}(PhQ)_2(Bpy\text{-}pyrrole)]$  sur l'efficacité de la catalyse de l'électrode modifiée vis-à-vis de l'oxydation de NADH, l'équation cette équation a été appliquée, cette fois ci en faisant varier la quantité de métallopolymère déposé et en fixant la vitesse de rotation de l'ET. La vitesse de rotation de l'électrode a été fixée à 300 tours par minutes et la concentration en NADH à 10 mM. La

concentration surfacique étant devenue variable, l'équation de Koutecky-Levich présente cette fois ci la courbe  $1/I_{lim}$  en fonction de  $\Gamma_{Ru}$  comme étant linéaire (Figure III.12). Dans ce cas, c'est la pente de cette droite ( $1/nFAkC_{NADH}$ ) qui donne accès à la constante  $k = 2,27.10^{-2} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Contrairement à précédemment, cette valeur de  $k$  représente une moyenne sur plusieurs électrode modifiées, ce qui peut expliquer la différence entre les deux valeurs.

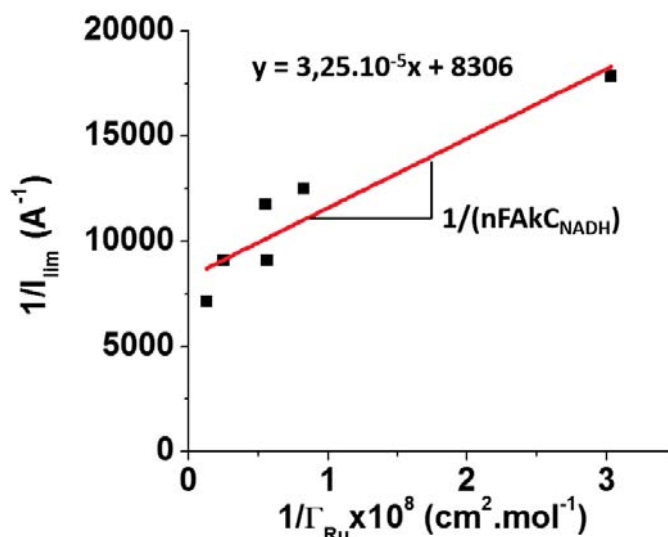


Figure III.12 : Courbe de  $1/I_{lim} = f(\Gamma_{Ru})$ , les valeurs expérimentales sont représentées par les carrés noirs. La courbe rouge représente la courbe de tendance

L'ordonnée à l'origine,  $8,3.10^3 \text{ A}^{-1}$  est en accord avec la valeur théorique de  $8,0.10^3 \text{ A}^{-1}$  calculée en prenant en compte :  $A = 0,07 \text{ cm}^2$ ,  $D_{NADH} = 2,4.10^6$ ,  $v = 0,091 \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ ,  $C_{NADH} = 10 \text{ mM}$  et  $\omega = 300$  tours par minute. Ceci souligne le fait que pour toutes les concentrations de métallopolymère l'équation de Koutecky-Levich est respectée. Afin de souligner la bonne adéquation du modèle linéaire, les courbes théoriques et expérimentales de  $I_{cat}$  en fonction de  $\Gamma_{Ru}$  et  $I_{lim}/\Gamma_{Ru}$  en fonction de  $\Gamma$  ont été tracées (Figure III.13 A et B).

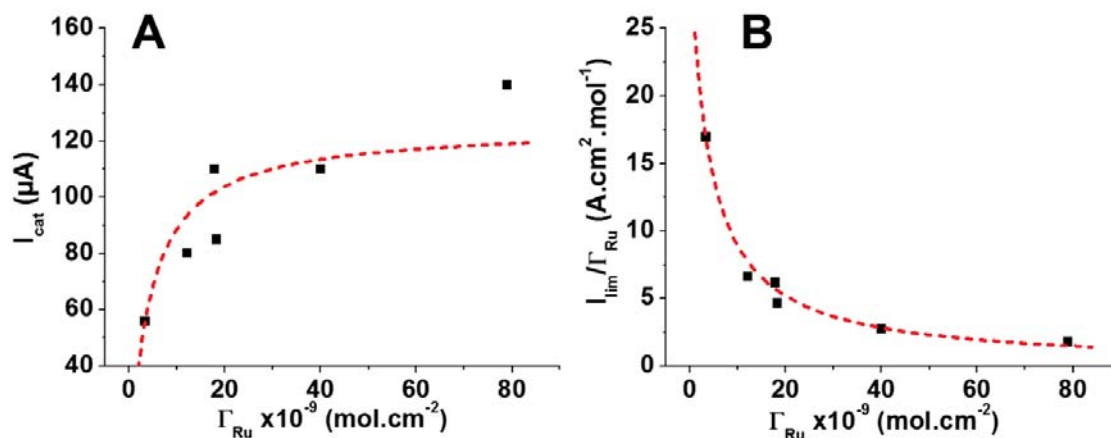


Figure III.13 : A) Courbe de  $I_{cat}$  en fonction de  $\Gamma_{Ru}$  avec les valeurs expérimentales (carrés noirs) et courbe d'ajustement avec l'équation de Koutecky-Levich (pointillés rouges) B) Courbe de  $I_{lim}/\Gamma_{Ru}$  en fonction de  $\Gamma_{Ru}$  avec les valeurs expérimentales (carrés noirs) et courbe d'ajustement avec l'équation de Koutecky-Levich (pointillés rouges)



Les points expérimentaux présentés en Figure III.13 A sont proches des valeurs obtenues avec le modèle de Koutecky-Levich. De ce graphe ressort que la valeur du courant limite de catalyse d'oxydation de NADH augmente avec la quantité de métallopolymère électrodéposé jusqu'à se stabiliser pour des valeurs de concentrations de surface élevées. En revanche, le graphe Figure III.13 B qui présente la contribution faradique du catalyseur immobilisé en fonction de la quantité de métallopolymère montre que plus la quantité de complexe immobilisée est importante, moins la contribution de chaque catalyseur vis-à-vis du courant catalytique est grande.

En comparant les résultats obtenus avec les valeurs théoriques, il apparaît que les fortes concentrations de surface en métallopolymère électrodéposé (jusqu'à 80 nmol.cm<sup>-2</sup>) ont une très faible influence sur la constante  $k$ . Aussi, à l'inverse de l'électrode de carbone vitreux, les électrodes modifiées de MWCNTs permettent l'immobilisation d'un bien plus grand nombre de catalyseurs à leur surface et donc l'obtention d'un courant catalytique anodique plus important. Bien que la hausse de la concentration de surface en poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] sur MWCNTs mène, à des  $\Gamma_{Ru}$  élevés, à une diminution de la catalyse effectuée par un unique site, la valeur globale  $I_{lim}$  de courant catalytique obtenue continue de croître. Ce phénomène souligne l'importance des MWCNTs et de leur grande surface 3D permettant la déposition d'une grande quantité de catalyseur sans perte de performances catalytiques de l'électrode modifiée.

### III.2.3 Propriétés d'encapsulation du métallopolymère

Grâce aux propriétés amphiphiles du monomère, la possibilité de capturer les enzymes au sein même du polymère électrogénéré a été envisagée. Le procédé consiste en deux étapes : dans un premier temps, un mélange enzyme-monomère est déposé à la surface de l'électrode MWCNTs. La seconde étape consiste en l'électropolymérisation en milieux aqueux du monomère déposé sur la surface engendrant la capture de la protéine au sein de polymère électrogénéré. Cette procédure a été très largement employée avec le monomère pyrrole amphiphile [12-(pyrrol-1-yl) dodecyl] triéthylammoniumtetrafluoroborate (R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole) pour l'élaboration de biocapteurs grâce à une encapsulation efficace d'enzymes<sup>58,59</sup>. Dans cette optique la capacité du poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] à capturer des protéines a été étudiée sur la PPO, comme modèle, ainsi que sur la GDH puis comparée avec le poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole) (Figure III.14 A et B). En effet, l'excellente propriété du poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole) à encapsuler la PPO a été décrite dans la littérature<sup>58</sup> et peut donc servir d'échelle pour quantifier et comparer ces mêmes propriétés dans le cadre de l'encapsulation dans le poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)].



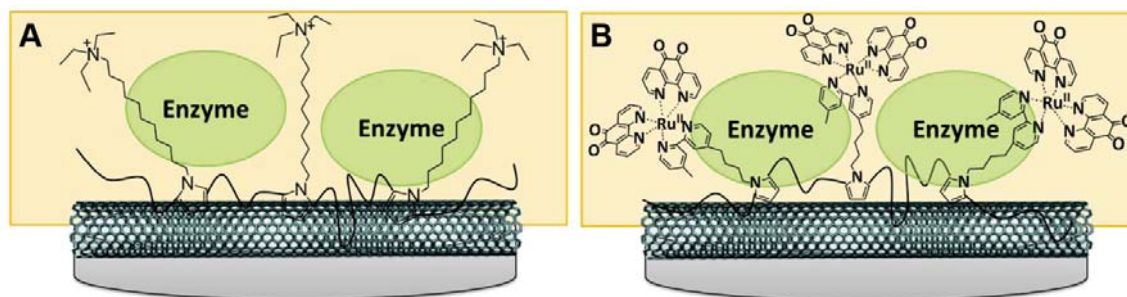


Figure III.14 : Représentation schématique de l'encapsulation par A) poly-( $R_4N^+$ -pyrrole) et B) poly-[ $Ru^{II}(PhQ)_2(Bpy-pyrrole)$ ]

Les solutions enzymes-monomères ont été déposées sur la surface des électrodes MWCNTs puis électropolymérisées par chronoampérométrie à 0,8V vs SCE dans du tampon phosphate 0,2 M pH7. La décharge est arrêtée lorsque le courant délivré devient résiduel. Etant donné que les polymérisations sont effectuées en solution aqueuse sans enzymes et monomères, il est possible de mesurer la quantité d'enzymes non capturées au cours de la polymérisation. Par mesure UV-Visible, les quantités d'enzymes non retenues dans le film et libérées dans l'électrolyte ont pu être déterminées par mesure d'activité enzymatique, ceci donnant donc accès à la quantité exacte de protéines capturées dans le métallopolymère en admettant que les activités des enzymes n'aient pas été diminuées par les étapes de séchage et de polymérisation (Figure III.15).

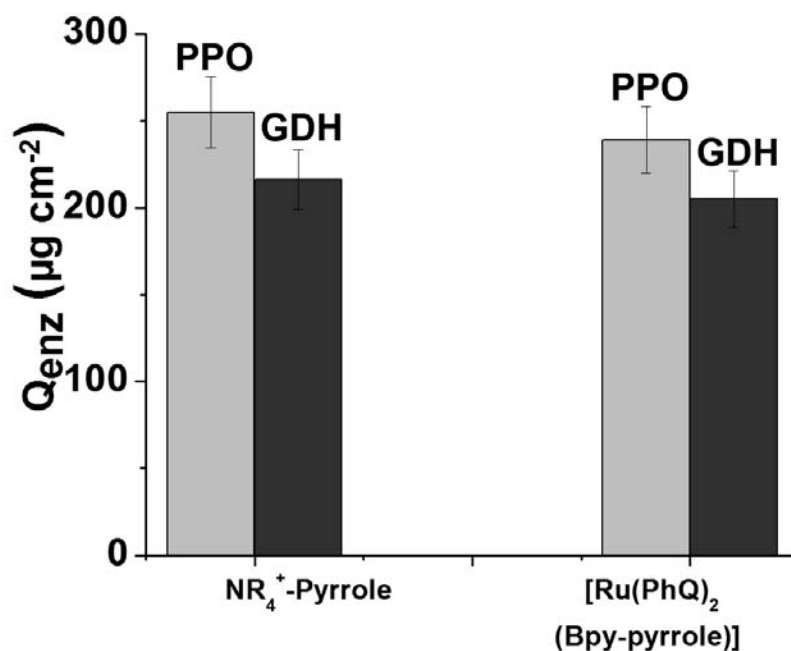


Figure III.15 : Quantité d'enzymes immobilisées pour la PPO et la GDH dans les composites MWCNTs/poly-( $R_4N^+$ -pyrrole) et MWCNTs/poly-[ $Ru^{II}(PhQ)_2(Bpy-pyrrole)$ ] après électropolymérisation par chronoampérométrie à 0,8 V dans TP 0,2 M pH7 (quantité totale d'enzyme déposé sur l'électrode avant polymérisation :  $280\ \mu g.cm^{-2}$ )

Les deux polymères amphiphiles permettent de capturer des quantités d'enzymes importantes, à savoir de 70 à 90% des enzymes déposées. Cependant, le poly-(Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)) permet, pour les deux types de protéines, la capture en moyenne 15% d'enzyme en moins par rapport à MWCNTs/poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole). Ceci est probablement dû aux plus grands rendement de polymérisation du monomère R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole, qui engendre moins de contraintes stériques que dans le cas du Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole).

### III.2.4 Bioanode MWCNTs/ poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]-GDH

Ce métallopolymère a donc démontré ses propriétés de catalyse d'oxydation de NADH ainsi que sa capacité à piéger efficacement des protéines lors de son électrodéposition sur matrice de MWCNTs. Ce dernier a donc été testé pour l'élaboration de bioanodes à glucose utilisant la glucose déshydrogénase.

Deux configurations de polymère ont été mises en place. La première consiste à préalablement fonctionnaliser l'électrode de MWCNTs avec le poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] et, dans un second temps, d'encapsuler la GDH dans un film de poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole) électrogénéré en milieu aqueux. La deuxième consiste à encapsuler la GDH en une seule étape au sein du film de poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] électrogénéré en milieu aqueux (Figure III.16 Figure III.16 B).

La GDH effectuant l'oxydation du glucose tout en réduisant NAD<sup>+</sup> en NADH, la réponse électrocatalytique des deux films a été étudiée en milieu tamponné à pH 7 et 37°C et en présence de 10 mM de NAD<sup>+</sup>. Dans le cas de l'association entre le poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] et poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole), deux étapes de fonctionnalisations ont été mises en œuvre. Dans un premier temps, le métallopolymère est électrogénéré en milieu organique puis la capture de l'enzyme dans poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole) est effectué dans un second temps en milieu aqueux (Figure III.16 A). Pour l'encapsulation de la GDH dans poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] la capture de l'enzyme se fait en une seule étape par électropolymérisation en milieu aqueux (Figure III.16 B). Pour les deux types d'électrodes, les CV montrent l'apparition d'un pic d'oxydation catalytique en présence de glucose au niveau du système rédox du ligand phendion (Figure III.17). Ce phénomène reflète l'électro-oxydation du glucose confirmant l'activité de la GDH capturée dans les deux types de films. En effet, le signal électrocatalytique observé reflète l'oxydation de NADH formé par la réaction enzymatique d'oxydation du glucose.

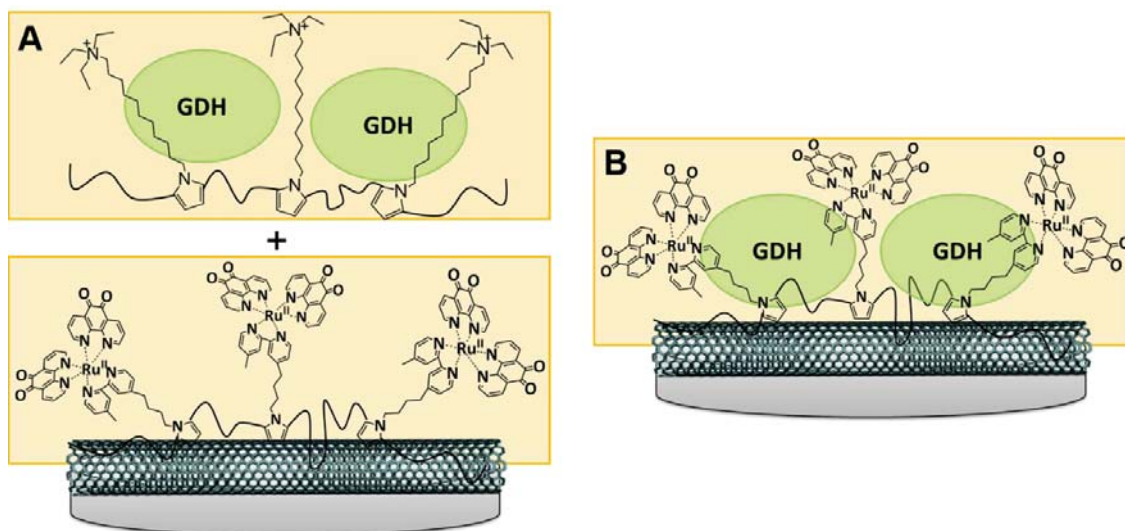


Figure III.16 : schémas représentatifs de A) électrode de MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole)-GDH et B) MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]-GDH

A 0,2 V, des courants catalytiques de 0,30 mA.cm<sup>-2</sup> et 0,53 mA.cm<sup>-2</sup> ont été obtenus respectivement avec l'association poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] et poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole) et avec poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] seul en présence de 10 mM de glucose et de 10 mM de NAD<sup>+</sup>. Dans le cas de la méthode à deux dépôts successifs, la diminution du signal rédox de l'espèce phénanthroline quinone après électrodéposition du poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole)-GDH s'explique par la baisse d'accessibilité de l'électrolyte vers le film de métallopolyimère (Figure III.17 A).

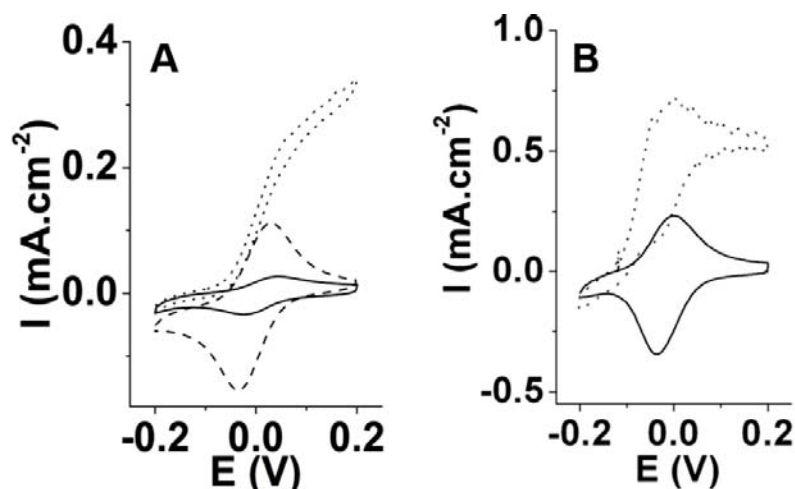


Figure III.17 : CV des électrodes de A) MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole)-GDH en absence (trait plein) et présence (pointillés) de 10 mM de glucose dans TP 0,2 M pH7 contenant 10 mM NAD<sup>+</sup> à 37°C ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ). La courbe en tiret représente l'électroactivité du film de MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] avant électrodéposition de poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole)-GDH et B) électrode de MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]-GDH en absence (trait plein) et présence (pointillés) de 10 mM de glucose dans TP 0,2 M pH7 contenant 10 mM NAD<sup>+</sup> à 37°C ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Les performances des deux bioanodes ont également été évaluées par chronoampérométrie à 0,1 V. La réponse en courant catalytique anodique en fonction de la quantité de glucose permet d'obtenir des courbes d'ajout présentant des profils de type Michaelis-Menten (Figure III.18). La méthode « couche par couche » permet d'obtenir une densité de courant maximale de 0,41 mA.cm<sup>-2</sup> avec une limite de détection de 10 µM de glucose. Avec le procédé à une seule étape *via* l'encapsulation de la GDH dans le métallopolymère, une densité de courant maximale de 1,04 mA.cm<sup>-2</sup> a été obtenue avec une limite de détection de 1 µM de glucose.

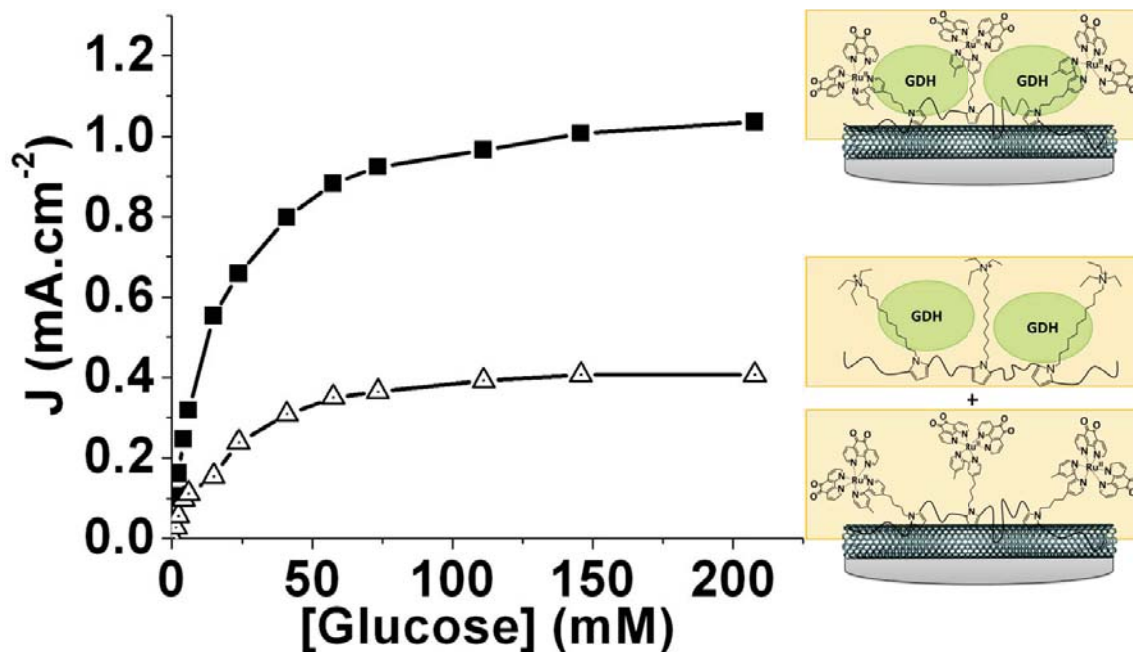


Figure III.18 : Courbes décrivant l'évolution du courant catalytique en fonction de la concentration en glucose obtenues par chronoampérométrie à 0,1 V pour les électrodes MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole)-GDH (triangles blancs) et MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]-GDH suivant l'addition de concentrations croissantes en glucose en présence de 10 mM de NAD<sup>+</sup> dans TP 0,2 M pH7 à 37°C

Les résultats obtenus en CV et en chronoampérométrie convergent vers une augmentation par facteur 2 du courant catalytique obtenu avec l'encapsulation de l'enzyme dans le film de poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] seul. Ceci est d'autant plus marquant que la quantité de protéine immobilisée grâce à cette méthode est inférieure (200 µg.cm<sup>-2</sup> contre 220 µg.cm<sup>-2</sup>). Ceci peut s'expliquer par un encombrement stérique plus important dans le cas de la méthode « couche par couche » empêchant ainsi la bonne diffusion du NADH formé vers la couche de métallopolymère située en dessous du film contenant la GDH. Dans le cas du procédé à une étape, l'accessibilité poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] pour le NADH généré enzymatiquement est beaucoup plus importante améliorant ainsi l'efficacité catalytique du métallopolymère. Tous ces résultats soulignent donc les avantages de l'utilisation du poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] d'une part pour l'oxydation de NADH et pour l'encapsulation d'enzymes NAD<sup>+</sup>-dépendantes.

### III.3 Elaboration d'une bioanode à base de Glucose déshydrogénase : approche supramoléculaire

#### III.3.1 Caractérisation du complexe RuQ-pyrène

Comme dans la partie précédente, l'immobilisation de l'entité *o*-quinone a été envisagée par l'intermédiaire de la coordination du ligand 1,10-phenanthroline-5,6-quinone sur un complexe de ruthénium incorporant un ligand Bpy porteur d'une fonction d'ancrage. La fonction d'accroche portée par le complexe est ici un pyrène, ayant la capacité de s'adsorber sur la surface des matériaux carbonés  $\pi$ -conjugué *via* des interactions non-covalentes de type «  $\pi$ -stacking ». Il existe dans la littérature un certain nombre d'exemples d'immobilisation d'électrocatalyseurs sur CNTs tirant avantage des propriétés de «  $\pi$ -stacking » des entités pyrène<sup>43,46,60</sup>. De la même manière, l'utilisation de molécules à base de pyrène a aussi permis l'immobilisation de protéine redox<sup>61-63</sup>.

La synthèse (Figure III.19) s'est faite à partir du même complexe intermédiaire bisubstitué [(1,10-phenanthroline-5,6-dione)<sub>2</sub>Ru<sup>II</sup>Cl<sub>2</sub>] et de (4,4'-bis(4-pyren-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine) dont la synthèse a également été décrite dans une étude antérieure<sup>61</sup>.

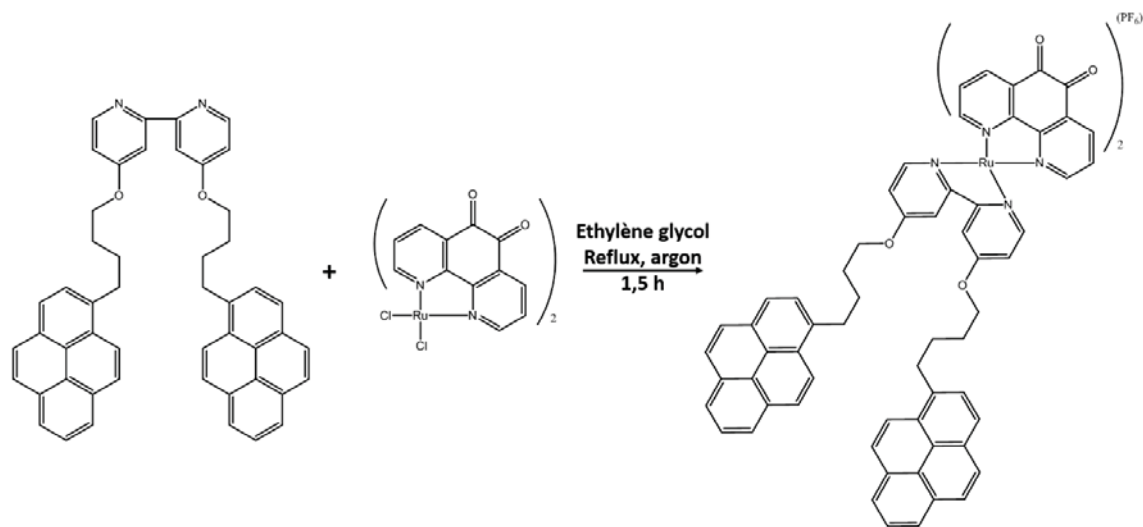


Figure III.19 : schéma de la synthèse du complexe [(1,10-phenanthroline-5,6-dione)<sub>2</sub>((4,4'-bis(4-pyren-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine)Ru<sup>II</sup>)] hexafluorophosphate

Le complexe [(1,10-phenanthroline-5,6-dione)<sub>2</sub>((4,4'-bis(4-pyren-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine)Ru<sup>II</sup>)] hexafluorophosphate (RuQ-pyrène) a donc été synthétisé par condensation de l'intermédiaire [(1,10-phenanthroline-5,6-dione)<sub>2</sub>Ru<sup>II</sup>Cl<sub>2</sub>] et du ligand (4,4'-bis(4-pyren-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine) à reflux dans l'éthylène glycol, sous atmosphère d'argon pendant

1,5h. Le complexe RuQ-pyrène est obtenue sous forme d'une poudre orange avec un rendement de 68%. Le complexe a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$ , spectroscopie de masse et par UV-visible. Ses propriétés rédox en solution ont été observées par CV dans MeCN 0,1 M TBAP sur électrode de GC et MWCNTs (Figure III.20). Les électrodes de MWCNTs ont cette fois-ci été élaborées par une méthode de dépôt d'une solution de MWCNTs dispersés dans du N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Le dépôt de  $20 \mu\text{L}$  de la dispersion permet d'obtenir des films de CNTs stables et reproductibles d'une épaisseur de l'ordre de  $5 \mu\text{m}$ . Des expériences électrochimiques ont confirmées que cette technique permettait l'obtention de films aux propriétés similaires de ceux réalisés par filtration d'une dispersion de MWCNTs en milieu aqueux utilisées dans la partie précédente, à condition de déposer des épaisseurs équivalentes.

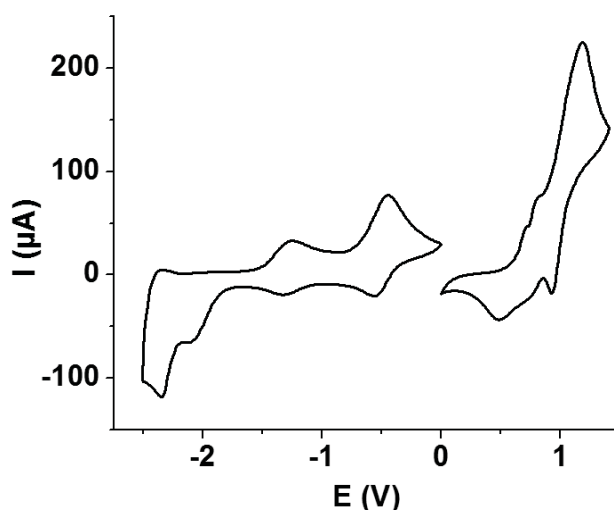


Figure III.20 : CV de RuQpyrène sur électrode de GC à 1 mM de complexe dans MeCN 0,1 M TBAP ( $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Le complexe présente un système de pics réversibles à  $E_{1/2} = 0.98 \text{ V}$  vs  $\text{Ag/AgNO}_3$  correspondant au système rédox  $\text{Ru}^{\text{II/III}}$  et un pic irréversible concomitant à  $E_p = 1 \text{ V}$  qui est attribué à l'oxydation irréversible des deux sous unités pyrènes. Deux systèmes quasi-réversibles sont observés respectivement à  $E_{1/2} = -0,50 \text{ V}$  et  $E_{1/2} = -1,30 \text{ V}$  qui correspondent aux deux réductions successives à  $1 e^-$  du ligand phendion. La réduction à  $1 e^-$  du ligand Bpy est observée à  $E^{1/2} = -2,34 \text{ V}$ .

### III.3.2 Immobilisation sur MWCNTs et catalyse de NADH

#### III.3.2.1 Immobilisation du dérivé RuQpyrène sur matrice de MWCNTs

Les interactions de «  $\pi$ -stacking » entre les groupements pyrènes et les parois des MWCNTs permettent la physisorption du complexe à la surface de l'électrode (Figure III.21A).



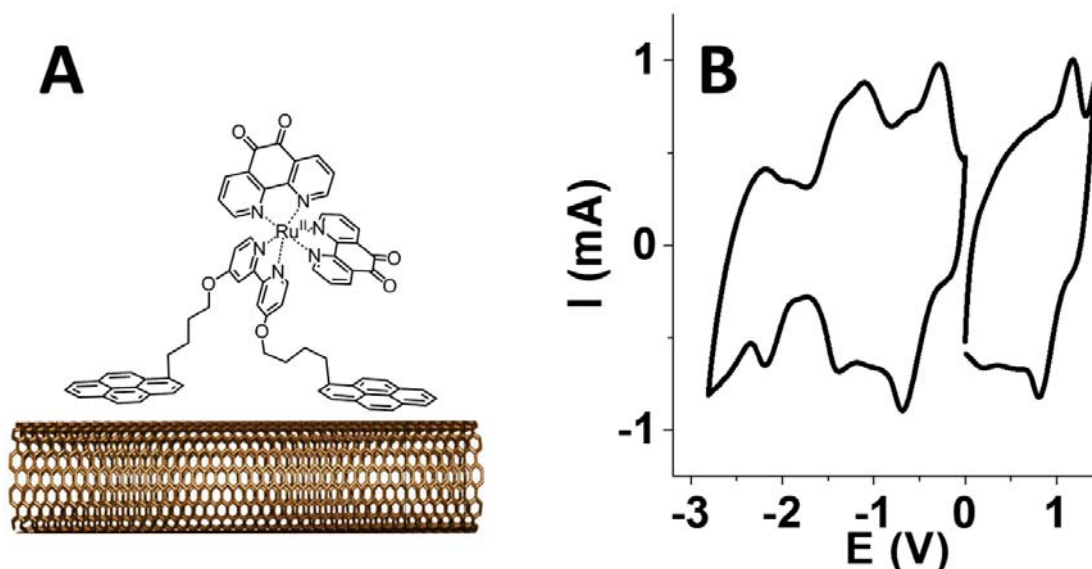


Figure III.21 : A) Représentation schématique du monomère RuQpyrène adsorbé sur le film de MWCNTs B) Caractérisation de l'électrode de MWCNTs de  $0,2 \text{ cm}^2$  fonctionnalisée avec RuQpyrène ( $43 \text{ nmol.cm}^{-2}$ ) en CV dans MeCN  $0,1 \text{ M TBAP}$  ( $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Pour fonctionnaliser les électrodes de MWCNTs, ces dernières ont été incubées pendant 1h dans des solutions de concentrations en complexe allant de 0 à 8 mM dans le DMF. Après rinçage, les électrodes fonctionnalisées ont été caractérisées par CV dans MeCN  $0,1 \text{ M TBAP}$ . Dans MeCN, l'électrode présente les signaux caractéristiques de l'espèce RuQpyrène immobilisés sur surface. Ceci s'accompagnent aussi notamment de pics de « charge trapping » (à  $-1,4$  et  $-2,2 \text{ V}$ ) qui sont fréquemment observés dans le cas d'immobilisation d'espèces rédox<sup>64</sup>.

En milieu aqueux, le système rédox à  $2 e^-$  du ligand phendion est observé à  $-0,02 \text{ V}$  vs SCE. Les pics d'oxydation et de réduction restent stables après de nombreux scans, témoignant donc de la force des interactions de «  $\pi$ -stacking ». Les concentrations de surfaces de l'espèce adsorbée ont été estimées par intégration de la charge correspondant au pic anodique obtenu en CV (Figure III.22A).



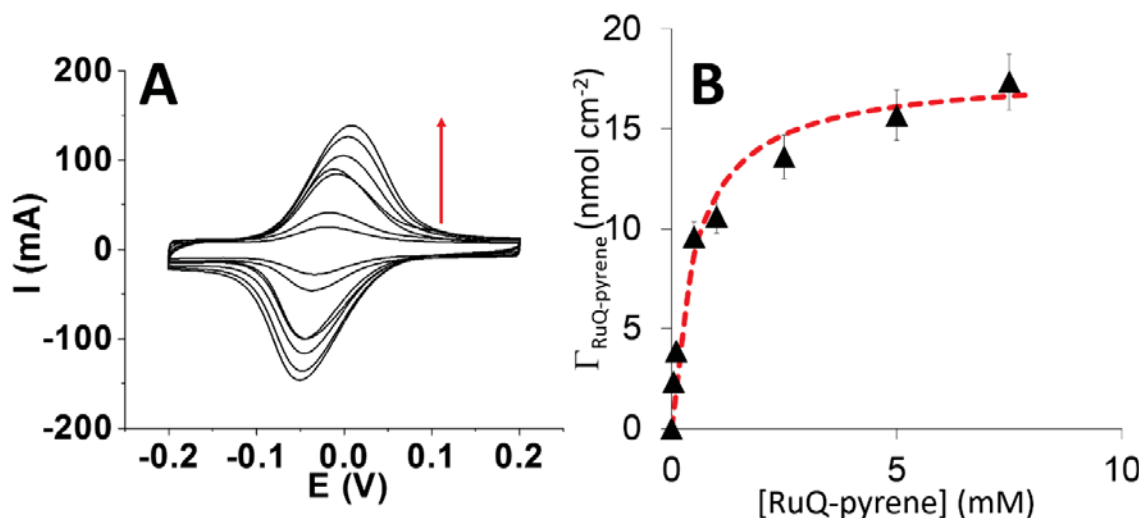


Figure III.22 : A) CV de RuQ-pyrène sur électrodes de MWCNTs dans TP (0,2 M, pH7) après incubation à différentes concentration (0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mM) en complexe dans du DMF ( $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) B) Variation de la concentration de surface en RuQ-pyrène en fonction de la concentration en monomère de la solution d'incubation dans le DMF accompagné de la courbe d'ajustement avec l'équation de l'isotherme de Langmuir (pointillés rouge)

La Figure III.22A montre les CVs des électrodes MWCNTs/RuQ-Pyrène obtenues après incubation dans des concentrations croissantes de complexe. Comme attendu, le signal rédox correspondant à la quinone augmente avec les concentrations d'incubation.

La Figure III.22B présente les variations de concentrations de surface obtenues suite à l'incubation de l'électrode de MWCNTs dans des concentrations croissantes en RuQ-pyrène dans du DMF à 25°C. La concentration de surface croît avec l'augmentation de la concentration en complexe suivant un isotherme de Langmuir, selon l'équation:

$$\Gamma_{eq,Ru} = \frac{\Gamma_{Ru_{max}} \times K_{Ru} \times [RuQpyrène]}{1 + K_{Ru} \times [RuQpyrène]}$$

Où  $\Gamma_{eq,Ru}$  est la concentration de surface à l'équilibre de RuQ-pyrène,  $\Gamma_{Ru_{max}}$  la concentration de surface saturante et  $K_{Ru}$  la constante d'association entre RuQ-pyrène et les MWCNTs dans le DMF à 25°C. Grâce aux points expérimentaux on obtient la courbe d'ajustement présentée Figure III.22B proches des valeurs expérimentales avec  $K_{Ru} = 1900 \text{ L.mol}^{-1}$  et  $\Gamma_{Ru_{max}}$  à 17,8 nmol.cm⁻².

La concentration de surface maximale équivaut à 220 couches compacte de RuQ-pyrène, mettant en avant la grande surface spécifique du film de MWCNTs.

### III.3.2.2 Catalyse d'oxydation de NADH

Les propriétés électrocatalytiques des électrodes fonctionnalisées ont été étudiées en milieu aqueux. Dans un premier temps, la catalyse d'oxydation de NADH par le ligand phendion a été observée (Figure III.23).

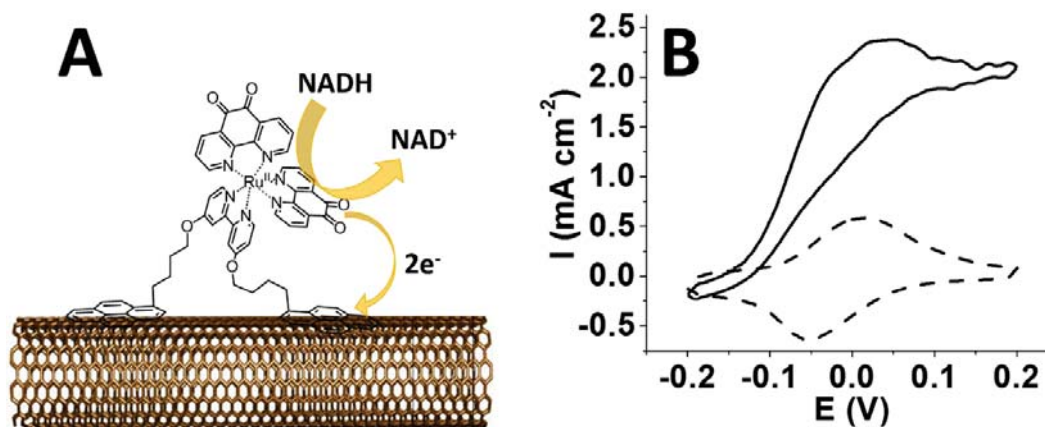


Figure III.23: A) schéma de la catalyse d'oxydation de NADH par le RuQ-Pyrène immobilisé sur MWCNTs B) CV de l'électrode de MWCNTs/RuQ-Pyrène (15,5 nmol.cm<sup>-2</sup>) en absence (tirets) et présence (trait plein) de 10 mM de NADH dans TP 0,2 M, pH 7, 25°C (ν = 10 mV.s<sup>-1</sup>)

A 10 mM de NADH, un pic anodique irréversible est obtenu avec un début de vague catalytique à -0,10 V proche du pic d'oxydation correspondant au passage de la forme réduite à la forme oxydé de l'*o*-quinone. Cette vague catalytique confirme les excellentes propriétés électrocatalytiques de l'électrode MWCNTs/RuQ-pyrène. Un maximum de courant catalytique de 2,5 mA.cm<sup>-2</sup> est notamment obtenu à 0,2 V en présence de 10 mM de NADH.

### III.3.3 Elaboration de la bioanode MWCNT/RuQ-pyrène/GDH

#### III.3.3.1 Bifonctionnalisation des MWCNTs

La possibilité de fonctionnaliser facilement le film de MWCNTs avec des espèces possédant un groupement pyrène par simple incubation dans une solution de dérivés pyrène permet l'élaboration d'électrodes bifonctionnelles. Contrairement au poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] étudié dans la partie précédente, où le métallopolymère a permis à la fois l'oxydation de NADH et l'encapsulation de l'enzyme, le RuQpyrène ne permet pas l'immobilisation de la protéine. Nous nous sommes donc orientés vers une bifonctionnalisation des MWCNTs par deux motifs pyrènes (Figure III.24).

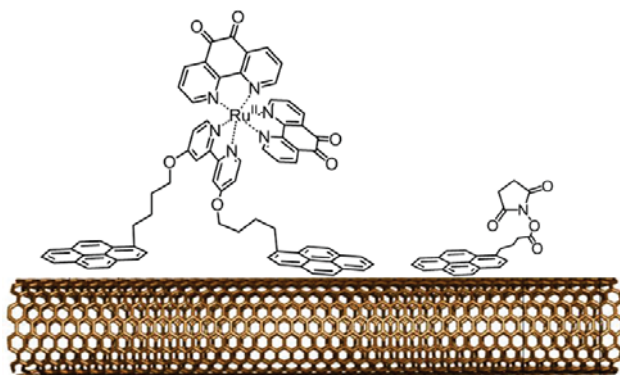


Figure III.24 : schéma de la double fonctionnalisation des MWCNTs par le complexe RuQpyrene et le dérivé pyrene-NHS permettant le greffage covalent de la protéine sur la surface

Le premier, RuQpyrene permet la régénération du cofacteur  $\text{NAD}^+$ . Le deuxième, un dérivé commercial de pyrene portant à son extrémité un ester activé, 1-pyrènebutyric acid N-hydroxysuccinimide ester (pyrène-NHS), rend possible le greffage covalent d'une enzyme déshydrogénase. L'électrode de MWCNTs modifiée a été caractérisée par CV et étudiée avec un modèle de Langmuir tenant compte de la bifonctionnalisation, en fonction du ratio des deux dérivés pyrènes (Figure III.25).

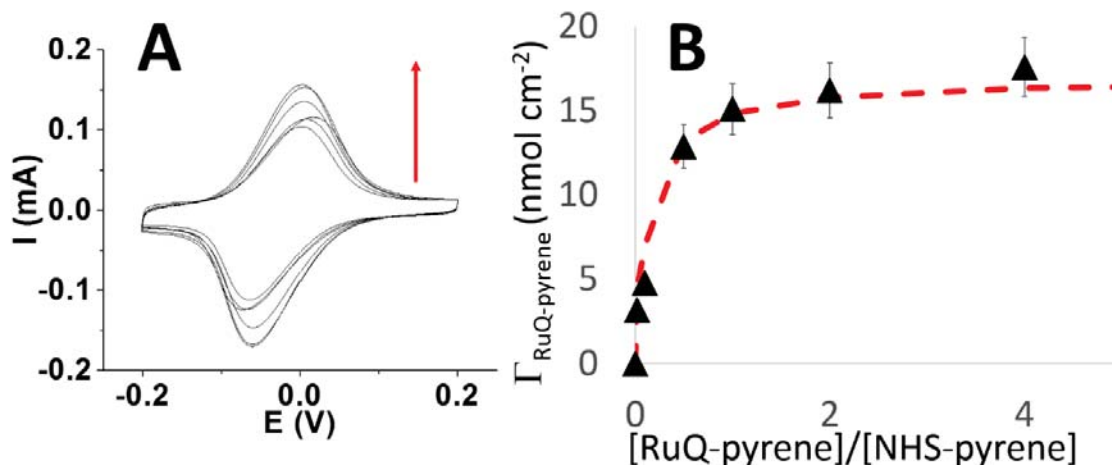


Figure III.25: A) CV des électrodes de MWCNTs fonctionnalisées dans TP (0,2 M, pH7) ( $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ), chaque scan représentant un ratio différent C) Variation de la concentration de surface en fonction des ratios RuQ-pyrène/Pyrène-NHS (0 ; 0,02 ; 0,1 ; 0,5 ; 2 ; 4) dans le DMF avec le fit correspondant à l'isotherme (tirets rouge)

Les électrodes de MWCNTs ont été incubées dans des solutions contenant différents ratio de RuQ-pyrène et pyrène-NHS. Comme pour le complexe seul, les concentrations de surface en  $\text{Ru}^{\text{II}}$  ont été quantifiées par CV dans l'eau (Figure III.25A).

Dans cette configuration encore, la concentration de surface en RuQ-pyrène augmente avec la concentration du complexe en solution. L'évolution de la quantité d'espèce immobilisées sur l'électrode dépend du ratio RuQ-pyrène/pyrène-NHS et suit ce cas une isotherme de Langmuir binaire compétitif suivant l'équation:

$$\Gamma_{eq,Ru} = \frac{\Gamma_{Ru_{max}} \times K_{Ru} \times \frac{[RuQpyrène]}{[pyrène - NHS]}}{\frac{1 + K_{Ru} \times [RuQpyrène]}{[pyrène - NHS]} + K_{pyrène-NHS}}$$

Qui équivaut à :

$$\Gamma_{eq,Ru} = \frac{\Gamma_{max} \times K_{Ru} \times RuQpyrène}{1 + K_{Ru} \times [RuQpyrène] + K_{pyrène-NHS} \times [pyrène - NHS]}$$

Où  $K_{NHS}$  est la constante d'association entre le pyrène-NHS et la paroi des MWCNTs dans le DMF à 25°C.

Cette équation est applicable dans la mesure où les deux espèces n'interagissent pas en solution dans une gamme de 0 à 10 mM et peuvent potentiellement s'adsorber sur les mêmes sites à la surface des MWCNTs. Ce modèle est corroboré par le fait que les constantes obtenues précédemment  $K_{Ru} = 1900 \text{ L.mol}^{-1}$  et  $\Gamma_{max} = 17,8 \text{ nmol.cm}^{-2}$  sont identiques en présence de pyrène-NHS. L'équation de l'isotherme de Langmuir binaire compétitif donne accès à la valeur de  $K_{NHS}$ ,  $180 \text{ L.mol}^{-1}$ , soit une valeur plus de dix fois plus faible que  $K_{Ru}$ . Ceci implique que RuQ-pyrène interagit de manière bien plus importante avec la surface des MWCNTs. La présence de deux unités pyrène dans le complexe induit très certainement des interactions de «  $\pi$ -stacking » plus importantes que pour le pyrène-NHS. Ce résultat indique que pour un ratio élevé en RuQpyrène/pyrène-NHS, la surface est quasiment totalement recouverte de catalyseur. Afin d'avoir une quantité suffisante de pyrène-NHS sur la surface pour permettre un greffage efficace de l'enzyme un ratio 1 ;1 est donc choisi pour les expériences qui suivent.

### III.3.3.2 Elaboration de la bioanode

Les électrodes de MWCNTs fonctionnalisées avec RuQ-pyrène et pyrène-NHS ont par la suite été utilisées pour l'immobilisation covalente de glucose déshydrogénase par formation d'un lien peptidique entre le pyrène activé et la protéine. Cette modification a été effectuée simplement en incubant l'électrode fonctionnalisée dans une solution de GDH à  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans TP (0,2 M, pH7) pendant 6h (Figure III.26). Suite à l'incubation, l'électrode est rincée abondamment.

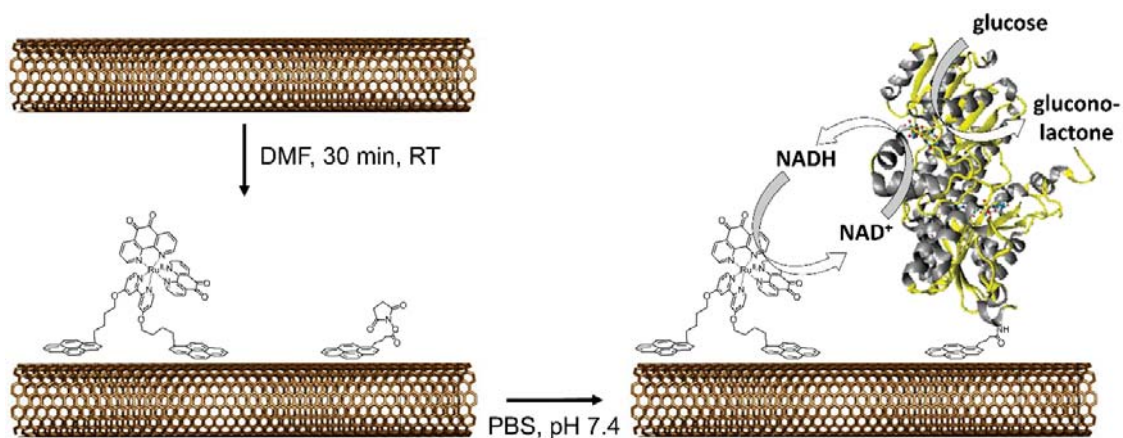


Figure III.26 : Schéma représentatif des fonctionnalisations successives de la surface des MWCNTs avec les deux composés pyrènes dans le DMF et l'étape de greffage covalent de l'enzyme GDH dans TP 0,2 M pH7 dans un second temps

Les propriétés catalytiques de la bioanode ont ensuite été évaluées par CV et par chronoampérométrie à 0,1 V suivant l'ajout de concentrations croissantes en substrat glucose et en présence de 10 mM de  $\text{NAD}^+$ .

La présence d'une concentration de 160 mM de glucose permet d'obtenir une vague d'oxydation irréversible débutant à -0,10 V et correspondant à l'oxydation de NADH généré enzymatiquement consécutivement à l'oxydation du glucose par la GDH.

Le courant catalytique d'oxydation obtenu atteint une valeur maximale de  $6,9 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  à 0,2 V (Figure III.27A).

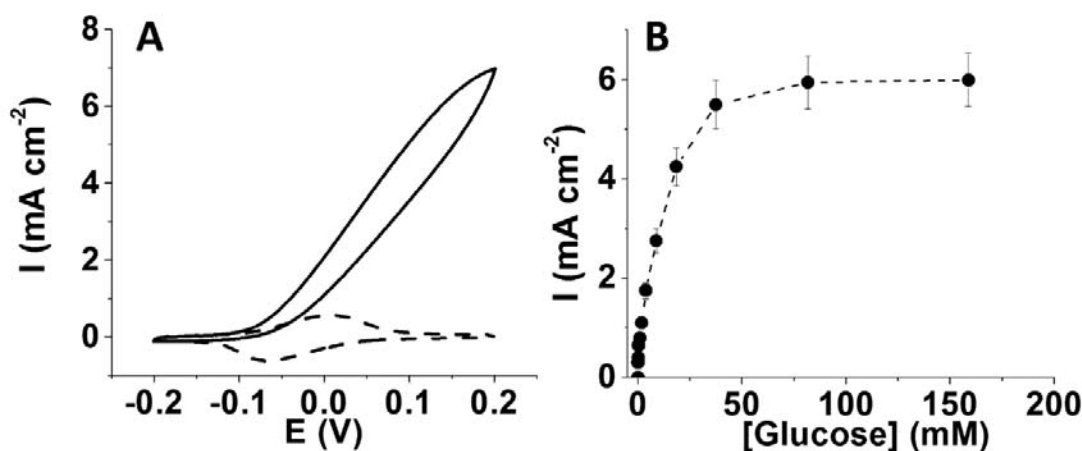


Figure III.27 : A) CV de l'électrode MWCNTs fonctionnalisée par RuQ-pyrène/pyrène-NHS (ratio 1 : 1) en absence (tirets) et présence (trait plein) de 160 mM de glucose dans TP (0,2 M, pH7) 10 mM de  $\text{NAD}^+$ , 37°C ( $\nu = 10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ) B) Courbe d'étalonnage des courants catalytiques obtenus en chronoampérométrie à 0,1 V de l'électrode MWCNTs/RuQ-pyrène/pyrène-NHS/GDH en fonction de la concentration de glucose dans TP (0,2 M, pH 7) 10 mM de  $\text{NAD}^+$ , 37°C

Les performances de la bioanode ont également été étudiées par mesures de chronoampérométrie à 0,1 V (Figure III.27B). Le courant catalytique augmente avec la concentration en glucose avec une dépendance de type Michaelis-Menten atteignant de hauts courants d'oxydation de l'ordre de 1,95 mA.cm<sup>-2</sup> à 5 mM de glucose et un maximum de 6,0 mA.cm<sup>-2</sup> à 70 mM de glucose.

Par ailleurs, pour les différents ratios de RuQ-pyrène/pyrène-NHS les cinétiques enzymatiques des GDH immobilisées sur la surface des MWCNTs ont été évaluées par mesure de l'activité enzymatique en UV-Vis grâce au suivi de l'apparition de la bande d'absorption de NADH à 340nm. Ces mesures donnent accès aux quantités réelles d'enzymes greffées sur surface. Comme attendu, au vu du calcul des constantes d'association  $K_{Ru}$  et  $K_{NHS}$ , ainsi que de la différence de taille entre le complexe et la protéine, les quantités d'enzymes immobilisées sur la surface sont très peu différentes d'un ratio à un autre. Ces mesures de cinétique UV-visible ont permis de remonter à une quantité d'environ  $7.10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup> de GDH immobilisée sur la surface correspondant approximativement à 8 couches compactes de protéines. Ces valeurs permettent également d'obtenir un ratio catalyseur/enzyme d'une valeur de 260 à la surface de la bioélectrode. Cette forte concentration de complexe par rapport à la protéine permet d'assurer une régénération efficace du cofacteur NAD<sup>+</sup> nécessaire à la catalyse d'oxydation du glucose par la GDH toute en ayant une importante quantité d'enzymes greffées à la surface des MWCNTs. Ceci met encore une fois en avant la capacité de la matrice de MWCNTs à immobiliser une grande quantité de protéine et de catalyseurs<sup>65</sup>.

### III.3.4 Comparaison des approches supramoléculaire et polymérique

#### III.3.4.1 Comparaison pour l'oxydation de NADH

Les deux méthodes d'immobilisations, par polymérisation ou par interactions supramoléculaire mènent à des performances différentes.

Dans les deux cas, il est cependant possible de contrôler la quantité de catalyseur greffée sur la surface des MWCNTs, soit en contrôlant le nombre de balayage en potentiel lors de la polymérisation dans le cas du monomère à base de pyrrole, soit en modulant la concentration de complexe pour l'incubation de l'électrode dans le cas du catalyseur porteur de la fonction pyrène.

Néanmoins, par polymérisation il est possible d'immobiliser une très grande quantité de catalyseur à la surface de l'électrode (jusqu'à 80 nmol.cm<sup>-2</sup>). En comparaison, par «  $\pi$ -stacking » la concentration de surface maximale atteinte est de 20 nmol.cm<sup>-2</sup>. La méthode par polymérisation permet donc d'immobiliser un plus grand nombre de catalyseur à la surface de



l'électrode. La Figure III.28A présente le signal du ligand phendion porté par le complexe dans ses deux configurations.

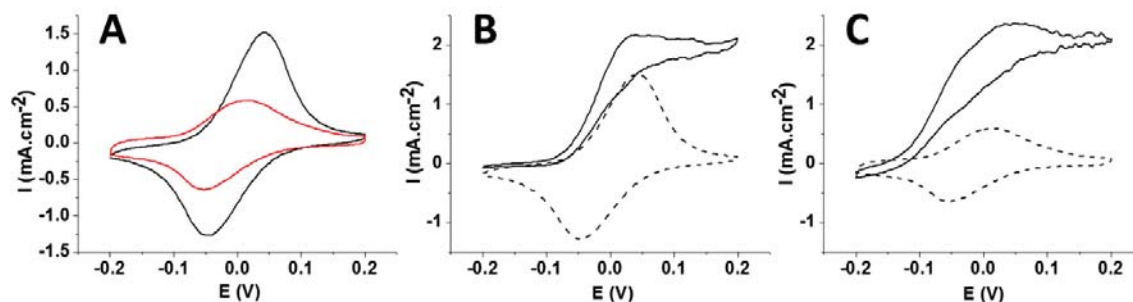


Figure III.28 : A) CV d'une électrode MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] avec  $\Gamma_{Ru} = 60 \text{ nmol.cm}^{-2}$  (courbe noire) et d'une électrode MWCNTs/RuQ-pyrène avec  $\Gamma_{Ru} = 15 \text{ nmol.cm}^{-2}$  (courbe rouge) dans TP (0,2 M, pH7) ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) B) CV d'une électrode MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] avec  $\Gamma_{Ru} = 60 \text{ nmol.cm}^{-2}$  en absence (pointillés) et présence (trait plein) de 10 mM de NAD<sup>+</sup> dans TP (0,2 M, pH7) ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) C) CV d'une électrode MWCNTs/RuQ-pyrène avec  $\Gamma_{Ru} = 15 \text{ nmol.cm}^{-2}$  en absence (pointillés) et présence (trait plein) de 10 mM de NAD<sup>+</sup> dans TP (0,2 M, pH7) ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Les CV de la Figure III.28B et C montrent les vagues de catalyse obtenus pour respectivement les électrodes de MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] et MWCNTs/RuQ-pyrène après l'ajout de 10 mM de NADH. Il est remarquable que la catalyse obtenue pour les deux types d'électrode est quasi identique, soit environ  $2 \text{ mA.cm}^{-2}$  alors que la quantité de complexe RuQ-pyrène est largement inférieure par rapport au poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]. L'équation de Koutecky-Levich a permis de s'apercevoir que grâce à l'utilisation de matrices de MWCNTs comme matériaux d'électrode, une grande quantité de complexe pouvait être immobilisée sur la surface sans avoir une influence négative sur la catalyse, phénomène qui est en revanche observé sur carbone vitreux. Cependant la catalyse de régénération de NAD<sup>+</sup> atteint un plateau à partir d'environ  $60 \text{ nmol.cm}^{-2}$  de catalyseur. Comme présenté sur la Figure III.29, la valeur de courant catalytique délivré par l'électrode de MWCNTs/RuQ-pyrène se trouve quasiment au niveau du plateau obtenu dans les résultats expérimentaux pour les électrodes MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] et corroborés par la simulation *via* Koutecky-Levich. Ceci est dû au fait que la constante  $k_{cat}$  est similaire, que le complexe soit modifié par un groupement pyrrole ou par un groupement pyrène.



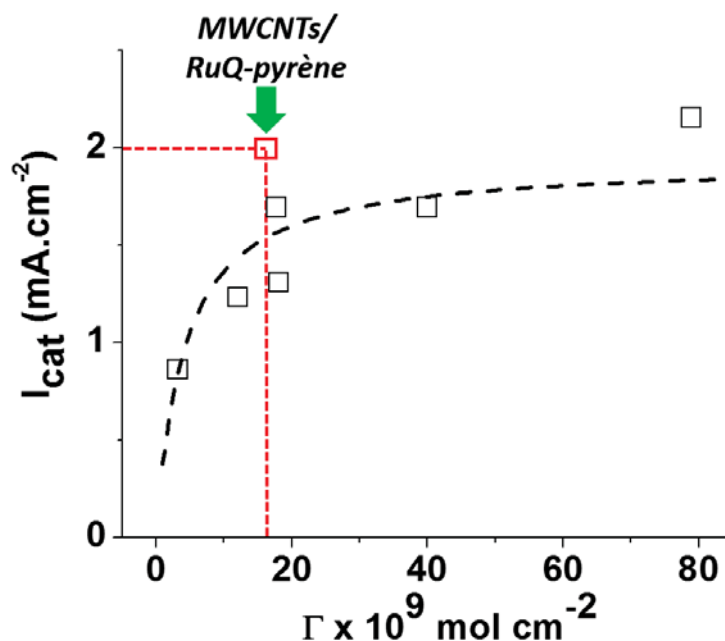


Figure III.29 : Tracé du courant de catalyse maximum obtenu avec MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] en fonction de la concentration de surface en poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)], point expérimentaux (carrés blancs) et courbe d'ajustement (pointillés). Points expérimentaux pour MWCNTs/RuQ-pyrène en rouge (conditions : CV en présence de 10 mM de NADH dans TP 0,2 M pH7 ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ))

De ces mesures, il ressort également que les performances en catalyse d'oxydation de NADH par le complexe sur MWCNT ne dépendent plus, à partir d'une certaine concentration (environ  $15 \text{ nmol.cm}^{-2}$ ), uniquement de la quantité de catalyseur sur l'électrode mais aussi de la diffusion du substrat vers le catalyseur. En effet, au-delà de cette concentration la quantité de métallopolymère n'a plus aucun effet sur le courant catalytique produit.

#### III.3.4.2 Comparaison en bioanode

Si les performances de régénération de  $\text{NAD}^+$  par le catalyseur immobilisé sont essentielles pour l'élaboration d'une bioanode à GDH, le greffage de l'enzyme sur l'électrode est également un paramètre prépondérant.

Pour les deux méthodes, l'accroche de l'enzyme est totalement différente. Dans le cas du poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)], la protéine est encapsulée au sein du métallopolymère électrogénéré lors de la polymérisation, tandis que lors de la fonctionnalisation non covalente des MWCNTs avec RuQ-pyrène, elle est greffée par le lien covalent de type amide.

Dans les parties 2) et 3), les quantités d'enzymes immobilisées ont pu être calculées. Pour l'encapsulation, la valeur de rétention de la protéine dans le film s'élève à  $200 \text{ } \mu\text{g.cm}^{-2}$  et pour le lien amide  $7,1 \text{ mol.cm}^{-2}$  de GDH, soit  $61 \text{ } \mu\text{g.cm}^{-2}$  ont été greffées sur la surface de MWCNTs.

Les densités de courant atteintes avec les deux approches en oxydation du cofacteur sont proches, de l'ordre de  $2 \text{ mA.cm}^{-2}$ , logiquement puisqu'il s'agit de la même structure de base. Cependant les courants maximums obtenus par oxydation du glucose par la glucose déshydrogénase sont différents (Figure III.30 A et B). Les électrodes de MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/GDH et MWCNTs/RuQ-pyrène/GDH ont permis d'obtenir respectivement  $1,04 \text{ mA.cm}^{-2}$  et  $6,0 \text{ mA.cm}^{-2}$  (Figure III.30 C).

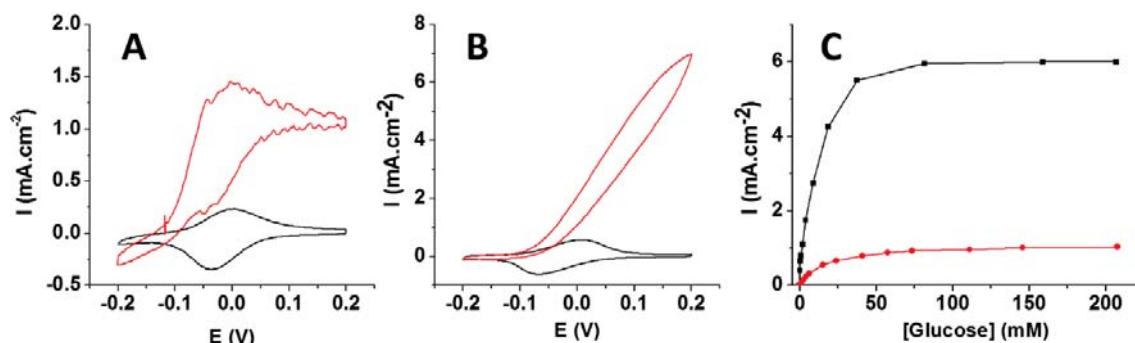


Figure III.30 : A) CV de MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/GDH en absence (courbe noire) et présence (courbe rouge) de 200 mM de glucose, 10 mM NAD<sup>+</sup>, dans TP (0,2 M, pH7) 37°C sous agitation ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) B) CV de MWCNTs/RuQ-pyrène/GDH en absence (courbe noire) et présence (courbe rouge) de 200 mM de glucose, 10 mM NAD<sup>+</sup>, dans TP (0,2 M, pH7) 37°C sous agitation ( $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ ) C) Courbe d'étalonnage des bioanodes MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/GDH (courbe rouge) et MWCNTs/RuQ-pyrène/GDH (courbe rouge) obtenu en chronoampérométrie à 0,1 V en fonction de la concentration en glucose en présence de 10 mM de NAD<sup>+</sup>, (TP 0,2 M pH7) 37°C, sous agitation

Comme établi précédemment, à partir d'une certaine concentration de surface en catalyseur,  $20 \text{ nmol.cm}^{-2}$ , les courants d'oxydations obtenus par l'oxydation de NADH se stabilisent à  $2 \text{ mA.cm}^{-2}$ . Les Figure III.30 A et B présentent les vagues catalytiques caractéristiques de l'oxydation de NADH produit consécutivement à l'oxydation du glucose par la GDH. Pour l'anode MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/GDH, les courants obtenus sont inférieurs ( $1,0 \text{ mA.cm}^{-2}$ ) à ceux relevés pour la régénération du cofacteur seul par le complexe. A l'inverse, pour la bioélectrode MWCNTs/RuQ-pyrène/GDH, les courants sont supérieurs ( $7 \text{ mA.cm}^{-2}$ ).

Ces résultats peuvent paraître contradictoires puisqu'une plus grande quantité de de protéine est immobilisée au sein du métallopolymère par rapport à l'approche supramoléculaire.

Plusieurs facteurs peuvent permettre d'expliquer ces résultats. Lors de l'élaboration de la bioanode MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/GDH la protéine est capturée au sein de métallopolymère électrogénéré. La formation du film, a un effet positif sur la quantité d'enzymes encapsulées mais peut en revanche se faire au détriment de la bonne diffusion des substrats jusqu'au biocatalyseur sachant qu'à la fois le glucose et NAD<sup>+</sup> doivent tous deux arriver jusqu'à la protéine pour permettre une catalyse efficace. Le film polymérique peut donc

avoir un effet barrière. Aussi, une autre possibilité est la dénaturation de certaines protéines au sein du film qui, lors de l'électropolymérisation peut éventuellement avoir un effet de contrainte stérique potentiellement inactivant pour l'enzyme. Enfin, les étapes de séchage et polymérisation peuvent également induire l'inactivation de certaines protéines.

Inversement, dans le cas de l'anode MWCNTs/RuQ-pyrène/GDH, les quantités de catalyseurs sont optimales ( $20 \text{ nmol.cm}^{-2}$ ) et bien que la quantité de protéine immobilisée soit inférieure, les courants catalytiques obtenus sont plus importants ( $6 \text{ mA.cm}^{-2}$ ). Dans cette architecture supramoléculaire, les propriétés de grandes surfaces spécifiques des MWCNTs sont particulièrement exploitées. En effet, le processus de «  $\pi$ -stacking », très simple à effectuer, possède l'avantage de ne pas générer de gêne stérique au sein de l'électrode. La diffusion des espèces, glucose et  $\text{NAD}^+$ , y est idéale. Cette méthode a également l'avantage d'immobiliser l'enzyme et non pas de l'encapsuler. Dans cette configuration, l'activité de l'enzyme se rapproche de celle de l'enzyme libre en solution. Avec la présence de la GDH, à forte concentration en substrat glucose et à concentration fixe en  $\text{NAD}^+$ , il est possible de faire l'hypothèse que la concentration en NADH produit localement à l'électrode est supérieure à  $10 \text{ mM}$  de  $\text{NAD}^+$  en solution ce qui permettrait d'expliquer l'augmentation par facteur 3 des courants maximums de catalyse en présence de glucose par rapport à NADH seul à  $10 \text{ mM}$ .

La simplicité de conception de l'anode GDH par approche supramoléculaire et ses performances pour l'oxydation du glucose en présence de  $\text{NAD}^+$  en font un outil précieux pour la conception de bioélectrode à base de déshydrogénase  $\text{NAD}^+$ -dépendante.

### III.3.5 Conception d'un biopile glucose- $\text{O}_2$ par combinaison de l'anode MWCNTs/RuQ-Pyrène-GDH avec une cathode de Bilirubin Oxidase

Outre les applications dans les biocapteurs, ces électrodes modifiées à bases de déshydrogénase peuvent également être utilisées comme anode pour une biopile enzymatique. La possibilité d'élaborer une biopile basée sur l'oxydation du glucose par la GDH et la réduction de l'oxygène par la Bilirubin Oxidase (BOD) a donc été envisagée.

La bioanode a été conçue de manière similaire à celle décrite précédemment. A la place d'un disque de carbone vitreux, les MWCNTs ont été déposés sur du feutre de carbone permettant d'élaborer des électrodes flexibles particulièrement intéressantes notamment pour des expériences *in vivo*. La cathode se base sur la connexion directe de la BOD sur matrice de MWCNTs également déposée sur GDL (Figure III.31).

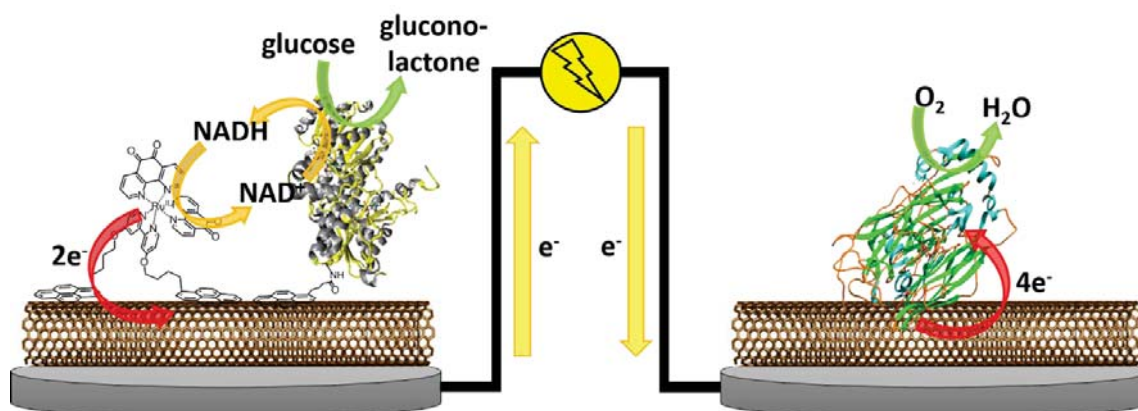


Figure III.31 : Schéma représentatif de la biopile composée de la bioanode MWCNTs/RuQ-Pyrène/GDH (à gauche) et de la cathode MWCNTs/BOD (à droite)

La cathode a été élaborée à partir d'une électrode de MWCNTs préalablement incubée dans une solution de bilirubine puis consécutivement, dans une solution de BOD. La bilirubine a pour effet d'améliorer les performances du transfert direct entre l'électrode et l'enzyme adsorbé sur la surface<sup>66</sup>.

La biopile a été caractérisée dans des conditions proches du milieu physiologique et en condition non limitantes en substrat (Figure III.32 A et B). La courbe de puissance a pu être obtenue grâce à des décharges de chronoampérométrie.

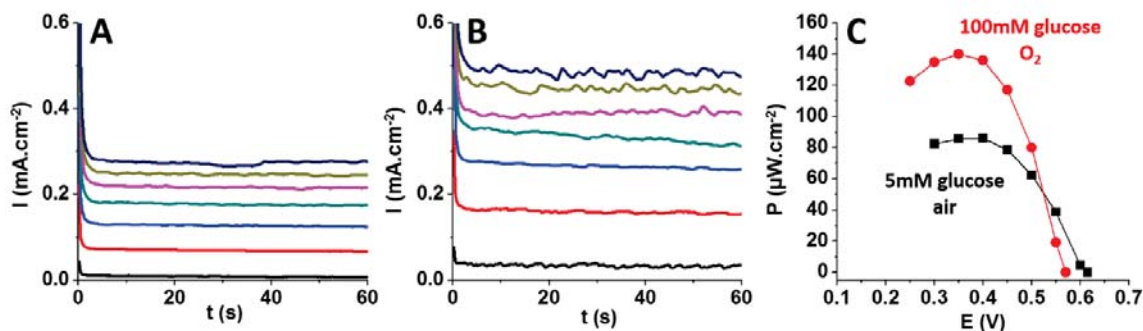


Figure III.32: A) décharge à  $E_{app}$  : 0,6 ; 0,55 ; 0,5 ; 0,45 ; 0,4 ; 0,35 et 0,3 V de la pile GDH/BOD en présence de 5 mM de glucose et 10 mM de  $NAD^+$ , sous air et dans TP 0,2 M à pH 7 et 37°C B) décharge à  $E_{app}$  : 0,55 ; 0,5 ; 0,45 ; 0,4 ; 0,35 ; 0,3 et 0,25 V de la pile GDH/BOD en présence de 100 mM de glucose et 10 mM de  $NAD^+$ , sous bullage de  $O_2$  et dans TP 0,2 M à pH 7 et 37°C C) courbe de puissance tracée à partir des courants relevés à 60 secondes en chronoampérométrie en présence de 5 mM de glucose et sous air (courbe noire) et en présence de 100 mM de glucose et sous  $O_2$  (courbe rouge)

Dans les conditions proches du milieu physiologique, la biopile GDH/BOD possède une force électromotrice (f.e.m) de 0,61 V. Elle est capable de délivrer une puissance maximale de 86  $\mu W.cm^{-2}$  (soit 215  $\mu A.cm^{-2}$  à  $E_{app}$  = 0,4 V) (Figure III.32C). En conditions non limitantes en substrats cette même biopile présente une f.e.m de 0,57 V et permet d'obtenir une puissance maximale de 140  $\mu W.cm^{-2}$  (soit 400  $\mu A.cm^{-2}$  à  $E_{app}$  = 0,35 V) (Figure III.32C).

### III.4 Conclusion du chapitre 3

Ce chapitre est focalisé sur l'élaboration de différentes architectures d'électrodes visant à utiliser les propriétés catalytiques des enzymes de types déshydrogénase  $\text{NAD}^+$ -dépendantes.

La première partie a permis de décrire l'utilisation d'un métalpolymère électrogénéré à partir d'un complexe de Ruthénium incorporant à la fois un groupement électropolymérisable (pyrrole) et un groupement catalyseur de l'oxydation de NADH. Ce dernier a été utilisé à la fois pour l'encapsulation d'enzyme rédox et également pour la régénération du cofacteur  $\text{NAD}^+$ . Les propriétés de régénération du cofacteur ont dans un premier temps été décrites. Dans un second temps, la capacité du métalpolymère électrogénéré à encapsuler des protéines rédox sur matrices de MWCNTs a également été évaluée et comparée à un autre polymère largement utilisé pour l'encapsulation d'enzymes sur électrode. Ainsi, une bioanode basée sur l'encapsulation de glucose déshydrogénase au sein du métalpolymère a pu être élaborée. Cette bioanode a été capable de délivrer des courants catalytiques maximums d'oxydation du glucose de l'ordre de  $1,04 \text{ mA.cm}^{-2}$  tout en ayant un potentiel d'abandon de  $-0,1 \text{ V}$  en présence de  $\text{NAD}^+$  et de glucose à pH 7 et à  $37^\circ\text{C}$ .

Dans une seconde partie, l'élaboration d'une seconde bioélectrode pour l'oxydation du glucose par la GDH a été obtenue à partir de la fonctionnalisation supramoléculaire de films de MWCNTs. Tout d'abord, la fonctionnlisation des MWCNTs par un complexe de ruthénium portant le même motif phénanthroline quinone a été étudié. Grâce à la présence de deux sous unités pyrène sur le catalyseur, l'immobilisation du complexe sur la paroi des CNTs par interaction de «  $\pi$ -stacking » a pu être contrôlée et modélisée, suivant une isotherme de Langmuir. La propriété de l'électrode MWCNTs/RuQ-Pyrène à régénérer  $\text{NAD}^+$  a également pu être évalué.

A la suite de quoi, la double fonctionnalisation des MWCNTs a été effectuée par addition dans la solution d'incubation d'un autre dérivé pyrène permettant le greffage covalent d'enzyme par couplage peptidique. Cette dernière a aussi pu être modélisée via une isotherme de Langmuir binaire. Puis l'addition de GDH, greffée de manière covalente sur l'électrode a permis d'élaborer un deuxième type de bioanode « supramoléculaire » pour l'oxydation du glucose. Cette bioanode a été caractérisée et a notamment permis d'obtenir de forte densité de courants de l'ordre de  $1,9 \text{ mA.cm}^{-2}$  à  $5 \text{ mM}$  de glucose et jusqu'à  $6,0 \text{ mA.cm}^{-2}$  en présence de  $100 \text{ mM}$  de glucose et de  $10 \text{ mM}$  de  $\text{NAD}^+$  à  $37^\circ\text{C}$ .

La partie suivante s'est axée sur la comparaison des deux bioanodes décrites précédemment à la fois pour la régénération de  $\text{NAD}^+$  et pour l'oxydation du glucose en bioanode. Les propriétés

d'oxydation de NADH sont proches bien que l'anode MWCNTs/RuQ-pyrène permette l'obtention de courants catalytiques plus importants avec moins de catalyseurs immobilisés. Pour l'oxydation du glucose, les courants catalytiques délivrés par l'anode MWCNTs/poly-[RuII(PhQ)2(Bpy-pyrrole)]/GDH sont largement inférieurs. L'anode basée sur la fonctionnalisation supramoléculaire est donc plus appropriée pour l'élaboration de bioanodes ou de biocapteurs se basant sur la catalyse des déshydrogénases. Néanmoins, pour ces deux types de bioanodes, les performances catalytiques obtenues se situent parmi les meilleures de la littérature concernant les bioanode à bases de GDH NAD<sup>+</sup>-dépendantes. Des résultats récents décrivent l'obtention de courants catalytiques qui vont de 0,41 mA.cm<sup>-2</sup> (azine/hydrogel/composite CNTs)<sup>48</sup>, 1,5 mA.cm<sup>-2</sup> (bioélectrode combinée avec un système de microfluidique)<sup>69</sup> et jusqu'à 4,1 mA.cm<sup>-2</sup> (poly-lysine NADH sur fibre de carbone)<sup>9</sup>.

Les deux dernières parties du chapitre sont focalisées sur les applications possibles de bioanodes ou biocapteurs à partir de déshydrogénases NAD<sup>+</sup>-dépendantes en utilisant la méthode de fonctionnalisation supramoléculaire des MWCNTs par RuQ-Pyrène.

L'élaboration d'une biopile sur GDL combinant une anode MWCNTs/RuQ-Pyrène/GDH avec une biocathode de réduction de O<sub>2</sub> par connexion directe de BOD sur MWCNTs a également été effectuée. Cette pile a permis d'obtenir des densités de puissances intéressantes de l'ordre de 86 μW.cm<sup>-2</sup> en milieu restreint et proche du milieu physiologique et de l'ordre de 140 μW.cm<sup>-2</sup> en milieu non limitant en substrat et en présence de 10 mM de NAD<sup>+</sup>.

Ce chapitre décrit donc deux méthodes différentes d'immobilisation et de connexion de déshydrogénases NAD<sup>+</sup>-dépendantes pour des applications dans la biodétection et les biopiles enzymatiques.

Les performances des biopiles sont intéressantes mais un verrou subsiste, et plus spécialement pour les applications biomédicales : la présence de NAD<sup>+</sup> dans le milieu. Son immobilisation est donc à envisager pour rendre le dispositif viable dans d'éventuelles applications *in vivo*.



1. S. Calabrese Barton, J. Gallaway, and P. Atanasov, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 4867–4886.
2. M. J. Lobo, A. J. Miranda, and P. Tuñón, *Electroanalysis*, 1997, **9**, 191–202.
3. P. J. Elving, W. T. Bresnahan, J. Moiroux, and Z. Samec, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1982, **141**, 365–378.
4. B. W. Carlson and L. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 479–485.
5. G. T. R. Palmore, H. Bertschy, S. H. Bergens, and G. M. Whitesides, *J. Electroanal. Chem.*, 1998, **443**, 155–161.
6. B. Kowalewska and P. J. Kulesza, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 9564–9571.
7. Y. H. Kim, E. Campbell, J. Yu, S. D. Minter, and S. Banta, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 1437–1440.
8. U. Schröder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 3568–3569.
9. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, 2008, **2**, 133–138.
10. Y.-M. Yan, O. Yehezkeli, and I. Willner, *Chem. – Eur. J.*, 2007, **13**, 10168–10175.
11. W. Jia, G. Valdés-Ramírez, A. J. Bandodkar, J. R. Windmiller, and J. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 7233–7236.
12. A. L. Ghindilis, P. Atanasov, and E. Wilkins, *Electroanalysis*, 1997, **9**, 661–674.
13. M. J. Cooney, V. Svoboda, C. Lau, G. Martin, and S. D. Minter, *Energy Environ. Sci.*, 2008, **1**, 320–337.
14. J. Moiroux and P. J. Elving, *Anal. Chem.*, 1978, **50**, 1056–1062.
15. W. J. Blaedel and R. A. Jenkins, *Anal. Chem.*, 1975, **47**, 1337–1343.
16. H. K. Chenault and G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1987, **14**, 147–197.
17. J. M. Laval, C. Bourdillon, and J. Moiroux, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 4701–4706.
18. H. Jaegfeldt, A. B. C. Torstensson, L. G. O. Gorton, and G. Johansson, *Anal. Chem.*, 1981, **53**, 1979–1982.
19. H. Teymourian, A. Salimi, and R. Hallaj, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, **33**, 60–68.
20. F. Gao, X. Guo, J. Yin, D. Zhao, M. Li, and L. Wang, *RSC Adv.*, 2011, **1**, 1301–1309.
21. M. Musameh, J. Wang, A. Merkoci, and Y. Lin, *Electrochem. Commun.*, 2002, **4**, 743–746.
22. J. Chen, J. Bao, C. Cai, and T. Lu, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **516**, 29–34.
23. M. Wooten and W. Gorski, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 1299–1304.
24. T. Sugiyama, Y. Goto, R. Matsumoto, H. Sakai, Y. Tokita, and T. Hatazawa, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 452–457.
25. S. Cosnier, M. Fontecave, C. Innocent, and V. Nivière, *Electroanalysis*, 1997, **9**, 685–688.
26. S. Kochius, A. O. Magnusson, F. Hollmann, J. Schrader, and D. Holtmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **93**, 2251–2264.
27. C. Qi-Jin and D. Shao-Jun, *J. Mol. Catal. Chem.*, 1996, **105**, 193–201.
28. C. Degrand and L. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 5728–5732.
29. C. A. Goss and H. D. Abruna, *Inorg Chem*, 1985, **24**, 4263–4267.
30. H. Jaegfeldt, T. Kuwana, and G. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 1805–1814.
31. L. Geng, L. I. Boguslavsky, I. P. Kovalev, S. K. Sahni, H. Kalash, T. A. Skotheim, H. S. Lee, and V. Laurinavicius, *Biosens. Bioelectron.*, 1996, **11**, 1267–1275.
32. X. Mao, Y. Wu, L. Xu, X. Cao, X. Cui, and L. Zhu, *The Analyst*, 2011, **136**, 293.



33. N. Mano and A. Kuhn, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, **477**, 79–88.
34. N. Mano and A. Kuhn, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **498**, 58–66.
35. E. Katz, T. Lötzbeyer, D. D. Schlereth, W. Schuhmann, and H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.*, 1994, **373**, 189–200.
36. C. M. Colón and A. R. Guadalupe, *Electroanalysis*, 1998, **10**, 621–627.
37. H. Ju and D. Leech, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **345**, 51–58.
38. I. Catalin Popescu, E. Domínguez, A. Narváez, V. Pavlov, and I. Katakis, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, **464**, 208–214.
39. R. L. McCreery, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2646–2687.
40. M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 179–190.
41. A. L. Goff, V. Artero, B. Josselme, P. D. Tran, N. Guillet, R. Métayé, A. Fihri, S. Palacin, and M. Fontecave, *Science*, 2009, **326**, 1384–1387.
42. E. S. Andreiadis, P.-A. Jacques, P. D. Tran, A. Leyris, M. Chavarot-Kerlidou, B. Josselme, M. Matheron, J. Pécaut, S. Palacin, M. Fontecave, and V. Artero, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 48–53.
43. P. Kang, S. Zhang, T. J. Meyer, and M. Brookhart, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, n/a–n/a.
44. W. Zhang, A. U. Shaikh, E. Y. Tsui, and T. M. Swager, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 3234–3241.
45. I. Hijazi, T. Bourgeteau, R. Cornut, A. Morozan, A. Filoramo, J. Leroy, V. Derycke, B. Josselme, and S. Campidelli, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 6348–6354.
46. P. D. Tran, A. Le Goff, J. Heidkamp, B. Josselme, N. Guillet, S. Palacin, H. Dau, M. Fontecave, and V. Artero, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 1371–1374.
47. N. S. Lawrence and J. Wang, *Electrochem. Commun.*, 2006, **8**, 71–76.
48. M. T. Meredith, F. Giroud, and S. D. Minter, *Electrochimica Acta*, 2012, **72**, 207–214.
49. S. A. Kumar and S.-M. Chen, *Sensors*, 2008, **8**, 739–766.
50. Y. Yan, W. Zheng, L. Su, and L. Mao, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 2639–2643.
51. X. Li, L. Zhang, L. Su, T. Ohsaka, and L. Mao, *Fuel Cells*, 2009, **9**, 85–91.
52. C. W. Narváez Villarrubia, R. A. Rincón, V. K. Radhakrishnan, V. Davis, and P. Atanassov, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2011, **3**, 2402–2409.
53. S. Cosnier, A. Deronzier, and J. C. Moutet, *Inorg. Chem.*, 1988, **27**, 2389–2390.
54. Z. Wu, Z. Chen, X. Du, J. M. Logan, J. Sippel, M. Nikolou, K. Kamaras, J. R. Reynolds, D. B. Tanner, A. F. Hebard, and A. G. Rinzler, *Science*, 2004, **305**, 1273–1276.
55. A. Le Goff, M. Holzinger, and S. Cosnier, *Electrochimica Acta*, 2011, **56**, 3633–3640.
56. H. D. Abruna, T. J. Meyer, and R. W. Murray, *Inorg. Chem.*, 1979, **18**, 3233–3240.
57. Q. Wu, M. Maskus, F. Pariente, F. Tobalina, V. M. Fernández, E. Lorenzo, and H. D. Abruña, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 3688–3696.
58. S. Cosnier, J.-J. Fombon, P. Labbé, and D. Limosin, *Sens. Actuators B Chem.*, 1999, **59**, 134–139.
59. R. E. Ionescu, S. Cosnier, and R. S. Marks, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 6327–6331.
60. J. D. Blakemore, A. Gupta, J. J. Warren, B. S. Brunschwig, and H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 18288–18291.
61. A. Le Goff, K. Gorgy, M. Holzinger, R. Haddad, M. Zimmerman, and S. Cosnier, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 10216–10221.
62. S. Krishnan and F. A. Armstrong, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 1015–1023.

- 63. M. Bourourou, K. Elouarzaki, N. Lalaoui, C. Agnès, A. Le Goff, M. Holzinger, A. Maaref, and S. Cosnier, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 9371–9375.
- 64. A. L. Goff and S. Cosnier, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 3910–3915.
- 65. C. Mousty, J.-L. Bergamasco, R. Wessel, H. Perrot, and S. Cosnier, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 2890–2897.
- 66. J. A. Cracknell, T. P. McNamara, E. D. Lowe, and C. F. Blanford, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 6668–6675.
- 67. M. Togo, A. Takamura, T. Asai, H. Kaji, and M. Nishizawa, *Electrochimica Acta*, 2007, **52**, 4669–4674.



## Chapitre 4

# IV. Cathode bi-enzymatique pour la réduction de O<sub>2</sub>

IV.	Cathode bi-enzymatique pour la réduction de O <sub>2</sub> .....	153
IV.1	Réduction électrocatalytique de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : une alternative au MCOs.....	155
IV.1.1	Principe.....	155
IV.1.2	Réduction enzymatique de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par les peroxydases.....	156
IV.1.3	Alternative aux cathodes à base de MCOs.....	159
IV.2	Modification supramoléculaire des CNTs pour l'immobilisation et la connexion de HRP .....	161
IV.3	Cathode bi-enzymatique GOx-HRP.....	169
IV.4	Application de la biocathode GOx-HRP à une biopile glucose-O <sub>2</sub> .....	172
IV.5	Conclusions.....	175



## IV.1 Réduction électrocatalytique de $H_2O_2$ : une alternative au MCOs

La réduction électrocatalytique du dioxygène constitue une des étapes clef dans la conception des piles à combustibles. Plus particulièrement dans le cas des biopiles enzymatiques à glucose- $O_2$ , il est un substrat indispensable au fonctionnement de la bio-cathode et à la production d'un courant de réduction. Dans une grande majorité des piles enzymatiques, la réduction de l'oxygène à 4 électrons est réalisée par des métallo-protéines à cuivres (dites « Multicopper Oxidases » ou MCO) connectées directement ou indirectement à l'électrode<sup>1,2</sup>. Comme discuté précédemment, parmi ces MCO, la Bilirubin Oxidase (BOD) ou encore la Laccase (Lac) font partie des enzymes les plus utilisées à la cathode, en particulier en les connectant à des électrodes de nanomatériaux carbonés<sup>3-6</sup>. Ces enzymes ont l'avantage de pouvoir être connectées directement à la surface d'électrodes<sup>7</sup>. De plus, elles sont capables de réduire l'oxygène avec de très faibles surtensions.

Cependant, ces enzymes possèdent d'importantes limitations. La laccase est particulièrement acidophile<sup>8</sup>. De même, elle est naturellement inhibée par les ions halogénures ( $Cl^-$ ,  $F^-$ ). L'inhibition de l'enzyme est particulièrement effective à 140 mM en ions chlorures correspondant à la concentration en milieu physiologique<sup>9</sup>. Elle est également inhibée par le peroxyde d'hydrogène, qu'il soit issu d'une réduction incomplète de  $O_2$  ou de sa production par la GOx à l'anode<sup>10</sup>. La BOD est inhibée par un produit de réaction de l'urate, également présent en milieu physiologique<sup>11</sup>. L'utilisation de ces enzymes peut donc à terme être problématique pour l'élaboration de biopiles implantables puissantes et surtout stable dans le temps. Si des solutions ont été trouvées pour minimiser l'incompatibilité de ces protéines avec le milieu physiologique, par différentes techniques d'immobilisations<sup>12-14</sup> ou par modification de la protéine<sup>15</sup>, des alternatives à l'utilisation de ces MCO peuvent s'avérer nécessaires. Récemment, l'équipe de Wolfgang Schuhmann et la notre ont proposé de nouvelles électrodes basés sur la réduction du peroxyde d'hydrogène par la peroxydase<sup>16-18</sup>.

### IV.1.1 Principe

La réduction de l'oxygène en eau peut s'effectuer directement par un processus à 4 électrons et 4 protons :



Mais elle peut également avoir lieu en 2 étapes impliquant 2 électrons et 2 protons chacune :

- $O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$   $E_0 = 0,70 \text{ V Vs SHE}$
- $H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$   $E_0 = 1,78 \text{ V Vs SHE}$

$H_2O_2$  peut donc être considéré comme une espèce intermédiaire de la réduction du dioxygène en  $H_2O$ .

Il se trouve que le peroxyde d'hydrogène, faisant partie de l'ensemble des espèces réactives de l'oxygène (ROS en anglais), est produit de manière naturelle lors de nombreux processus biologiques. La production de ces ROS et donc de  $H_2O_2$  est souvent associée au phénomène de stress oxydant. La production dérégulée de peroxyde d'hydrogène peut donc avoir des causes néfastes sur le développement des cellules bien qu'il soit également avéré qu'il joue le rôle crucial de molécule « signal » au sein du métabolisme cellulaire<sup>19,20</sup>.

Il existe donc chez les organismes vivants une grande variété de protéines et d'organites, en particulier les mitochondries, capables de produire  $H_2O_2$ <sup>19-23</sup>. Parmi les protéines, l'exemple de la glucose oxydase (GOx) permet l'oxydation du glucose à 2 électrons et la réduction de  $O_2$  en  $H_2O_2$ <sup>24,25</sup>. En effet, la faible concentration de peroxyde d'hydrogène présente dans le milieu physiologique ne serait pas suffisante pour permettre le fonctionnement d'une biopile. Si ces ROS sont produits de manière naturelle, leur surconcentration dans le milieu cellulaire peut avoir des effets néfastes sur le métabolisme. C'est pourquoi il existe une vaste machinerie capable de réguler la concentration de ces espèces réactives, dont  $H_2O_2$ , au sein des cellules<sup>26,27</sup>. Ces moyens de contrôle incluent là encore une grande variété de protéines rédox capables de dégrader ces ROS, en addition aux molécules dites anti-oxydantes telles que les vitamines A,B et E ou encore la bilirubine<sup>20</sup>. Ces protéines de régulation permettent de réduire le peroxyde d'hydrogène. La catalase (Cat), la superoxyde dismutase (SOD), les peroxydases entre autre, sont capables de catalyser la transformation de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et en  $O_2$ <sup>26</sup>. Le principe de l'utilisation de  $H_2O_2$  à la cathode est donc basé sur la combinaison d'une enzyme telle que la GOx réalisant la réduction enzymatique de  $O_2$  en  $H_2O_2$  en milieu physiologique (en présence de  $O_2$  et de glucose) et d'une enzyme réalisant la réduction électroenzymatique de  $H_2O_2$ . Il faut pouvoir réduire  $H_2O_2$  de manière électro-catalytique au plus haut potentiel possible afin de pouvoir atteindre des valeurs de potentiels se rapprochant de celles des MCOs et du potentiel thermodynamique de réduction de l'oxygène.

#### IV.1.2 Réduction enzymatique de $H_2O_2$ par les peroxydases

Les peroxydases effectuent la réduction du peroxyde d'hydrogène en oxydant leurs substrats biologiques naturels. Elles constituent une large famille d'enzymes rédox. La plupart d'entre elles sont des enzymes à hème avec une protoporphyrine IX ferrique comme groupement



prosthétique (Figure IV.1). Elles catalysent la réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tout en réalisant l'oxydation d'une grande quantité de substrats (disproportionnation, époxydation, transfert d'électrons)<sup>28</sup>.

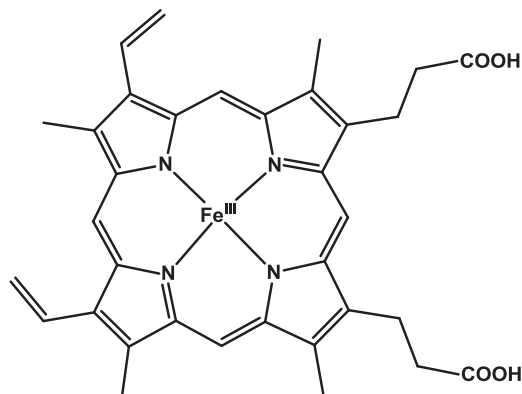


Figure IV.1 : Structure de l'hémine, protoporphyrine IX ferrique, groupement prosthétique de nombreuses peroxydase

Ces peroxydases ont la propriété de réduire le peroxyde d'hydrogène à de très hauts potentiels électrochimiques<sup>29</sup>, ce qui est particulièrement intéressant dans le cadre de l'élaboration d'une bio-cathode. Parmi cette classe de protéine, l'une des plus étudiée est la peroxydase de radis noir (Horseradish Peroxidase en anglais, HRP).

Cette glyco-enzyme possède un poids moléculaire de 42 kDa, un point isoélectrique de 8,8 et est glycosylée à 18%<sup>30</sup>. En 1997, la structure RX de cette protéine a également pu être établie<sup>31</sup>. Plus tard, en 2002 Berglund et al. ont réussi à caractériser et identifier plusieurs états intermédiaire du site actif enzymatique responsable de son activité catalytique<sup>32</sup>. La catalyse de réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la HRP fait intervenir des espèces à très haut degré d'oxydation et le mécanisme de leur formation est désormais connu (Figure IV.2)<sup>33</sup>.

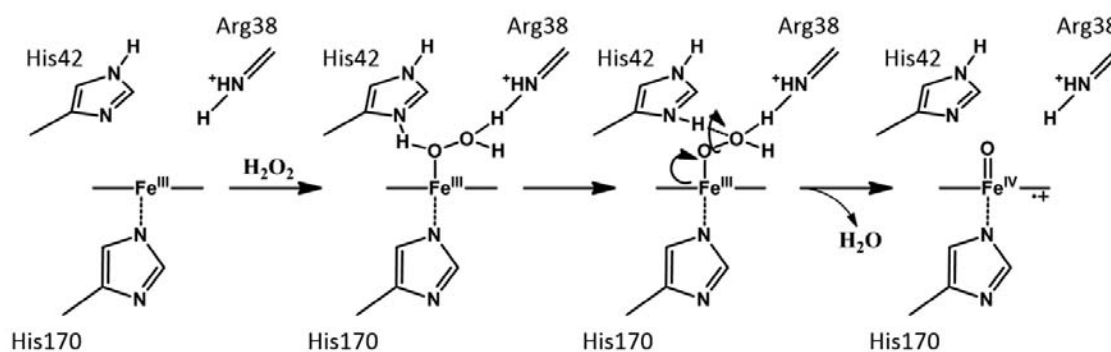


Figure IV.2 : Mécanisme proposé pour la formation du  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}^+$  de la peroxydase à partir de <sup>32</sup> et <sup>33</sup>

La position de l'hème à l'intérieur du site actif et son environnement protéique rendent possible la catalyse. En effet, la présence de deux résidus histidine (His42 proximal et His170 axial) et d'un résidu arginine (Arg38) facilitent la rupture hétérolytique de la liaison O-O. Cette coupure mène à la formation d'une espèce fortement oxydante de type  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}^+$ . Cet intermédiaire est

plus communément appelé composé I. C'est ce dernier qui réalise une première étape d'oxydation sur un substrat entraînant la formation du composé II sous la forme  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$  (Figure IV.3).

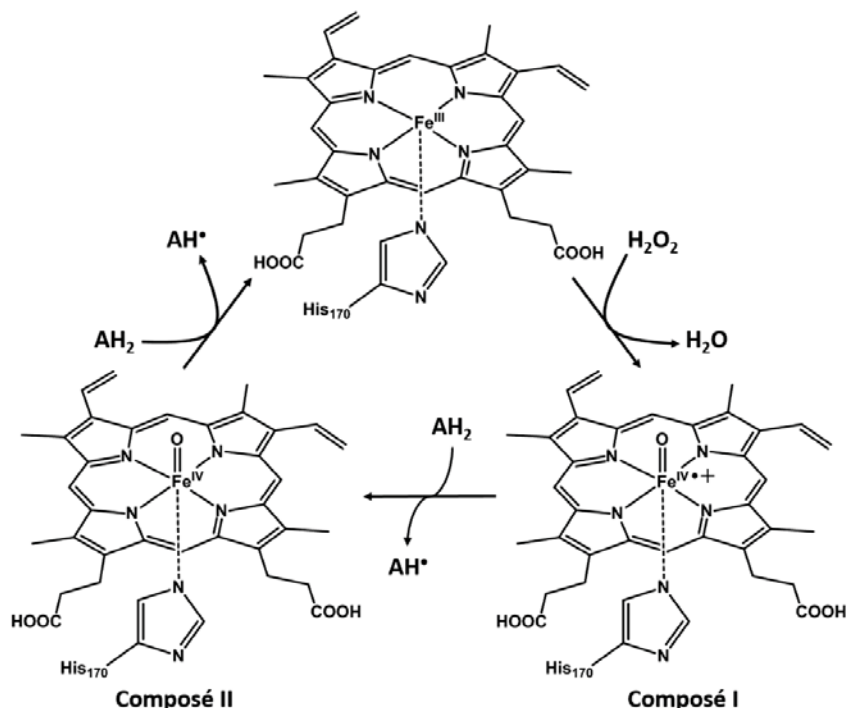


Figure IV.3 : Formation des composés I et II à haut potentiel rédox. Repris de Battistuzzi et al.<sup>29</sup>

Après la formation du composé I, la réduction jusqu'à la forme d'origine de l'hème se fait par l'intermédiaire de deux étapes à 1 électron chacune.

Ces composés I et II, stabilisés par l'environnement protéique, possèdent des potentiels rédox particulièrement élevés. Leur nature instable les rend particulièrement difficiles à observer. Cependant il existe un certain nombre de travaux reportant les valeurs des couples rédox de ces composés autour de 0,95 V Vs SHE<sup>29,34–36</sup>. La possibilité de connecter ces espèces directement sur électrode rend l'électro-réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  particulièrement attractive.

Depuis de nombreuses années, la HRP fait partie des enzymes les plus largement utilisées en bio-électrochimie, et un très grand nombre d'études décrivent sa connexion sur un vaste choix de matériaux d'électrodes<sup>25,26,33</sup>.

Comme pour toutes les protéines rédox, le transfert électronique entre la HRP et l'électrode peut se faire directement (DET) ou par incorporation d'un médiateur rédox sur la surface ou en solution (MET) (Figure IV.4). Par ces deux méthodes il est donc possible d'observer électrochimiquement les différentes étapes du processus catalytique.

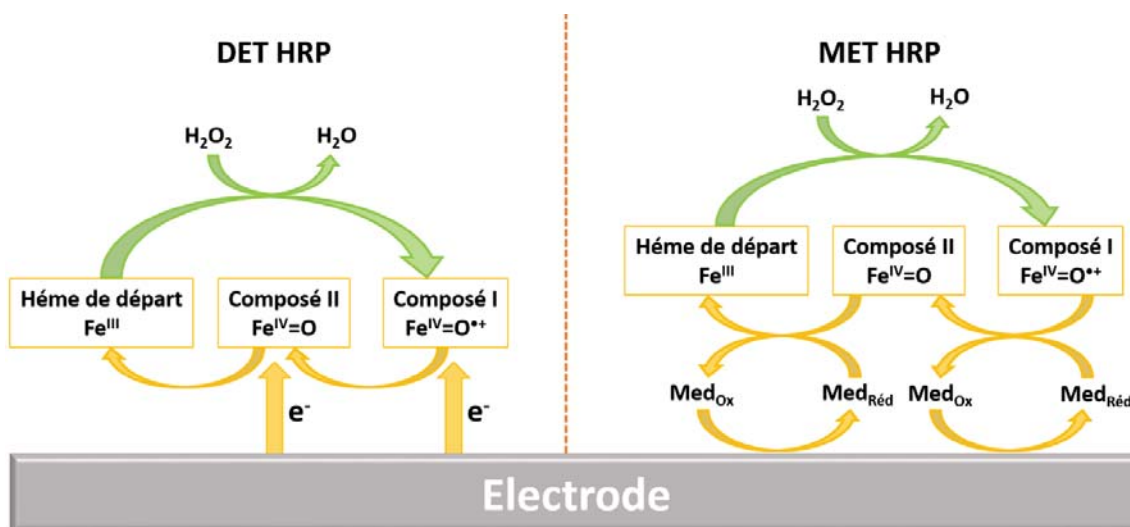


Figure IV.4 : Représentation schématique du DET (à gauche) et du MET (à droite) de la HRP sur électrode

La connexion de la HRP sur électrode doit permettre l'obtention d'un courant cathodique en présence de substrat  $H_2O_2$ . Idéalement, dans le cas où le transfert d'électron entre l'enzyme et l'électrode est favorisé, les potentiels auquel l'échange a lieu doivent se trouver le plus haut possible, proches des potentiels rédox des composés I et II, soit vers 0,9 V Vs SHE ou 0,65 V Vs SCE. En 1978, Yaropolov et al. décrivaient déjà la première connexion directe de HRP sur noir de carbone<sup>38</sup>. Depuis il existe dans la littérature une multitude d'exemples d'électrode s'appuyant sur le transfert électronique direct et indirect entre l'hème de la protéine et l'électrode<sup>29,30,37,39</sup>.

Par DET, des courants de catalyse ont pu être obtenus à partir d'environ 0,6 V Vs SCE sur de nombreux matériaux d'électrodes différents, notamment sur surface carbonées (graphite), d'or ou encore d'argent<sup>30,37,40-43</sup>. Les CNTs ont notamment permis d'augmenter les courants catalytiques obtenus, notamment grâce à leur grande surface spécifique permettant d'immobiliser un grand nombre de biomolécules<sup>44-46</sup>. Un des derniers exemples marquant a été l'utilisation d'un composite à base de fibre de carbone (CF) et de CNTs<sup>16</sup>. Ce design a notamment permis d'obtenir des courants catalytiques de réduction de  $H_2O_2$  de l'ordre de 800  $\mu A$  avec une vague catalytique débutant à 0,55 V Vs SCE.

### IV.1.3 Alternative aux cathodes à base de MCOs

La preuve a été faite qu'il existe de nombreux moyens de réduire électrocatalytiquement le peroxyde d'hydrogène. La connexion enzymatique, de la HRP entre autre, permet d'effectuer cette réduction à des potentiels intéressants, de l'ordre de 0,6V Vs SCE.

La stratégie, en ce qui concerne l'alimentation de dispositifs implantables consiste désormais à pouvoir produire  $H_2O_2$  à partir de substances présentes dans l'organisme. Comme énoncé précédemment, de nombreuses protéines ont pour produit de réaction le peroxyde d'hydrogène.

L'une d'entre elles, la glucose oxydase (GOx), convient parfaitement puisqu'elle produit  $\text{H}_2\text{O}_2$  à partir du dioxygène en réalisant l'oxydation du glucose. En théorie, il est donc possible d'effectuer la réduction de  $\text{O}_2$  à 2 électrons en peroxyde d'hydrogène de manière enzymatique en présence de glucose et, dans un deuxième temps, de réduire électrocatalytiquement  $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau par transfert d'électron direct entre la HRP connectée et l'électrode (Figure IV.5).

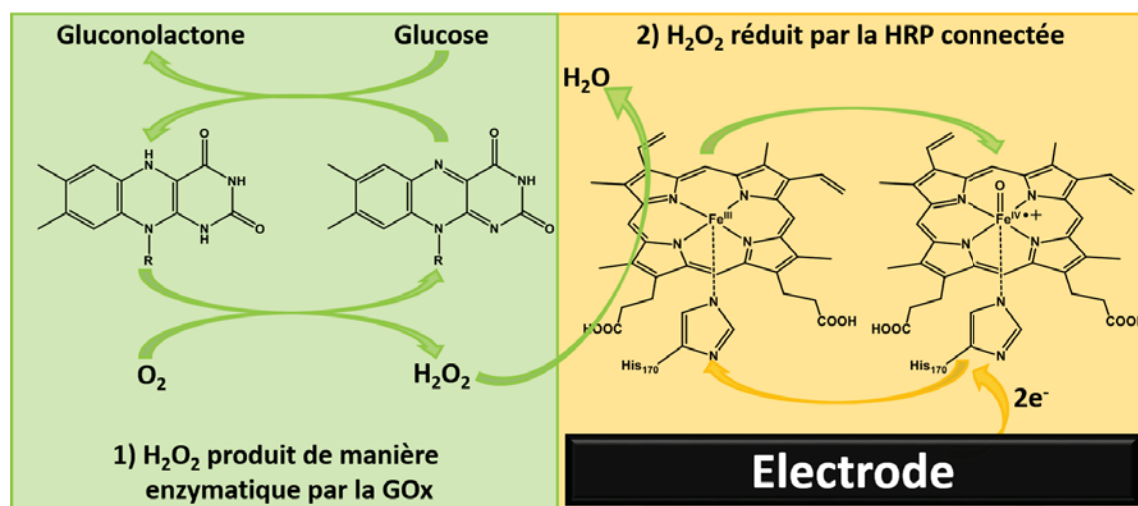


Figure IV.5 : Schéma du mécanisme de réduction de  $\text{O}_2$  par une première étape à  $2e^-$  réalisée enzymatiquement par la GOx puis par une deuxième étape à  $2e^-$  par la HRP connectée sur électrode

C'est dans cet objectif qu'en 2012, Schuhman et al. ont élégamment tiré avantage du système bi-enzymatique à base de GOx et de HRP connectée directement sur électrode modifiée de CNTs pour élaborer une bio-cathode réduisant le dioxygène en deux étapes. Lors de la première étape enzymatique, la GOx réduit l'oxygène tout en oxydant le glucose. La seconde étape électrocatalytique, permet la réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par le transfert direct de 2 électrons de l'électrode à la HRP (Figure IV.6)<sup>17</sup>. Ce système ingénieux permet de contourner les difficultés rencontrées avec les enzymes à cuivre (inhibition, pH).

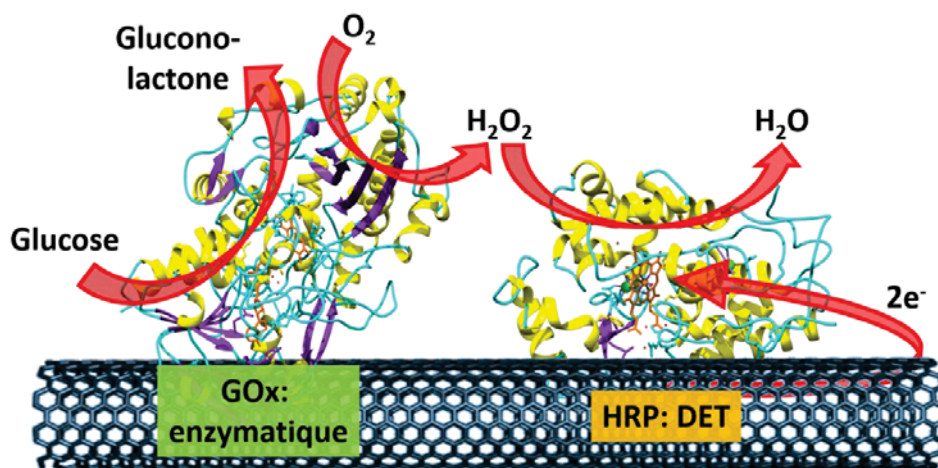


Figure IV.6 : Schéma du système bi-enzymatique GOx-HRP sur matrice de CNTs pour la réduction de  $O_2$  par Schuhman et al.<sup>17</sup>

Peu de temps après, notre équipe a également développé une bio-cathode basé sur ce concept, en connectant la HRP sur DWCNTs. Cette dernière a été employée dans une biopile avec une bioanode GOx/1,4-NQ présentée dans le chapitre 2 et a permis d'obtenir des puissances maximales de l'ordre de  $30 \mu W \cdot cm^{-2}$  avec une f.e.m de 0,45 V dans les conditions physiologiques<sup>18</sup>. De plus, il s'agit de produire  $H_2O_2$  consécutivement à l'oxydation du glucose, substrat présent en milieu physiologique. Cette nouvelle bio-cathode à glucose, intégrée dans une biopile pourrait s'avérer une alternative sérieuse pour les applications *in vivo*.

Afin d'accroître les performances de transfert d'électron conduisant à de meilleurs potentiels d'abandon et de meilleurs courants faradiques, nous nous sommes orientés vers la fonctionnalisation d'électrodes à base de nanotubes de carbone de manière non covalente pour améliorer l'immobilisation des enzymes GOx et HRP, ainsi que le transfert direct au niveau de la HRP.

## IV.2 Modification supramoléculaire des CNTs pour l'immobilisation et la connexion de HRP

Les techniques d'immobilisation d'enzymes sur divers types de surfaces pour la préparation de bio-électrodes pour les biocapteurs et bio-piles sont très nombreuses : physisorption, capture dans des polymères électro-générés ou nanomatériaux, greffage covalent, etc<sup>47,48</sup>. En outre, l'utilisation des CNTs comme matériaux d'électrodes a démultiplié les possibilités d'immobilisation des biocatalyseurs<sup>49</sup>.

Une méthode particulièrement appropriée pour l'immobilisation de protéines glycosylées, comme la HRP (glycosylée à 18%), consiste en l'utilisation de dérivés d'acides boroniques ( $B(OH)_2$ ). En effet, cette fonction chimique permet, dans des conditions très douces, la formation d'un lien covalent ester boronique par réaction avec les groupements des fonctions

diols et donc, par exemple, avec des résidus osidiques présents à la surface de l'enzyme (Figure IV.7)<sup>50</sup>. Si cette technique a été utilisée sur des chaînes polymériques ou encore sur couches auto-assemblées<sup>51</sup>, il existe peu d'exemples de combinaison avec les CNTs et pour l'immobilisation de la HRP<sup>52</sup>.

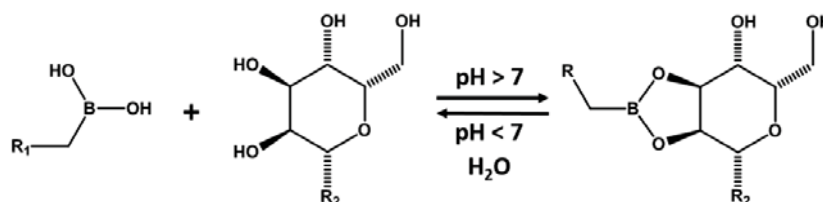


Figure IV.7 : Equilibre de formation de l'ester boronique entre un acide boronique et un dérivé saccharidique en milieu aqueux

Afin de développer une bio-électrode capable de réduire efficacement  $H_2O_2$  par transfert direct d'électron avec la HRP, des dérivés pyrènes porteurs de fonctions d'encrages acide boronique ou ester activé (NHS), décrits dans l'introduction<sup>53</sup>, ont été immobilisés sur CNTs par interactions de type «  $\pi$ -stacking ». Deux groupements pyrènes comprenant la fonction  $B(OH)_2$  ont été utilisés ainsi qu'un dérivé porteur d'une fonction NHS afin de comparer les propriétés d'accroche et de transfert électronique entre l'électrode et l'enzyme en fonction du type de lien et de la longueur de l'espaceur. Les différents groupement sont : pyrene-1-boronic acid (Pyrène 1), 1-(4-boronobenzyl)-3-(4-(pyren-1-yl)butanamido)pyridin-1-ium bromide (Pyrène 2) et 1-pyrene-butyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (Pyrène 3) (Figure IV.8).

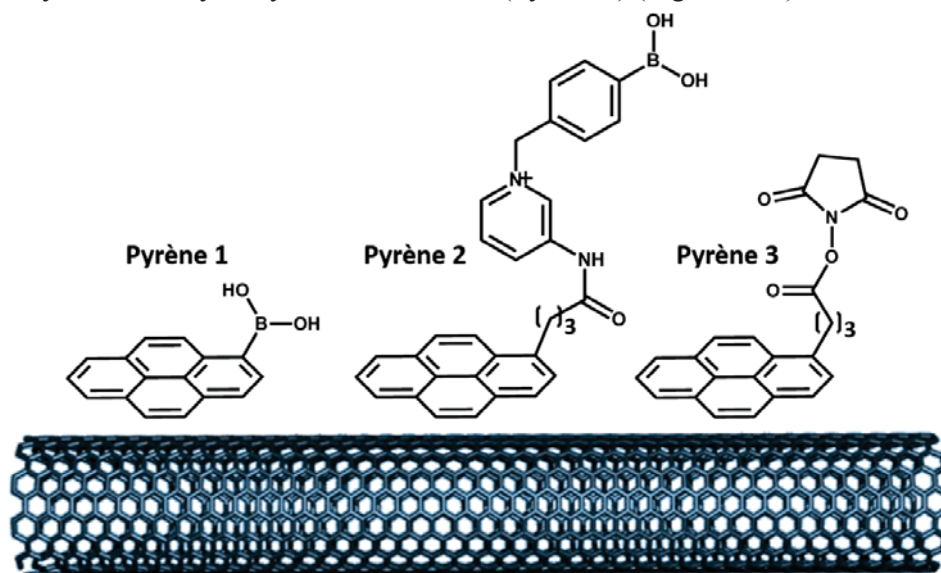


Figure IV.8 : Schéma représentatif de l'interaction de  $\pi$ -stacking entre un CNT et les différents dérivés pyrènes 1, 2 et 3

Les électrodes de MWCNTs utilisées pour cette étude ont été préparées selon la méthode décrite par Wu et al.<sup>54</sup> permettant l'obtention de films de CNTs très stable et d'épaisseur contrôlée. Le



transfert du film de MWCNTs obtenu sur électrode de carbone vitreux (GC) a permis d'obtenir des films d'une épaisseur de 4  $\mu\text{m}$ .

Les électrodes ont ensuite été fonctionnalisées par incubation dans des solutions de DMF contenant les différents dérivés 1, 2 et 3 à 10 mM pendant 1h. Après avoir été rincées abondamment à l'eau distillée, les électrodes ont été incubées pendant la nuit dans une solution PBS 0,1 M à pH 8 contenant 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  de HRP. Une électrode témoin, n'ayant pas été fonctionnalisée par un des dérivés pyrènes, a également été réalisée par simple physisorption de la protéine dans les mêmes conditions que les électrodes porteuses des fonctions pyrènes.

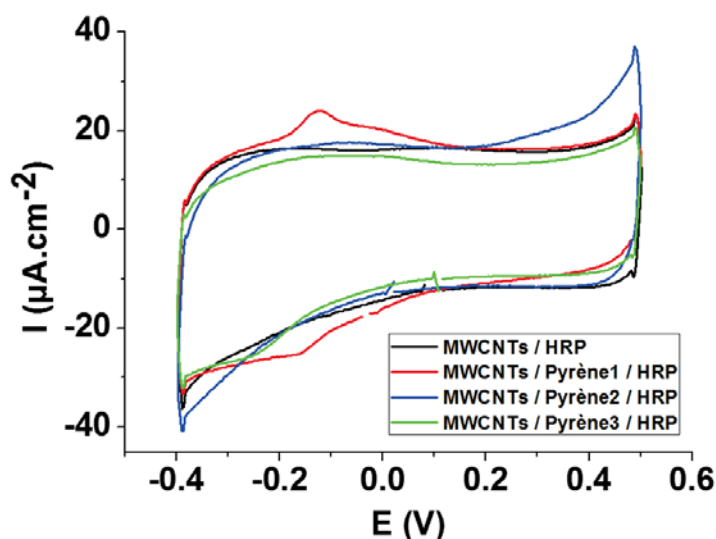


Figure IV.9 : CV des bio-électrodes de MWCNTs/HRP (courbe noire), MWCNTs/Pyrène1/HRP (courbe rouge), MWCNTs/Pyrène2/HRP (courbe bleue) et MWCNTs/pyrène3/HRP (courbe verte) après incubation dans une solution de HRP à 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  dans PBS, pH 8, mesures à  $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$  dans PBS 0,1 M, pH 7,4 à 25°C

Les CV des bio-électrodes ayant été incubées dans une solution de HRP à 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  dans du PBS pH 8 ont été réalisées après rinçage des électrodes (Figure IV.9). L'électrode fonctionnalisée par le monomère pyrène 1 présente un système de pic réversible à  $E_{1/2} = -0,14 \text{ V Vs SCE}$  (avec  $\Delta E = 40 \text{ mV}$ ). Ce système rédox est caractéristique du couple  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  de l'hème ferrique interne à la protéine et immobilisé sur la surface de l'électrode de MWCNTs. Ce système n'est pas observé sur l'électrode témoin de MWCNTs/HRP et non plus pour MWCNT/pyrène2/HRP. Pour l'électrode MWCNTs/Pyrène3/HRP, un système faiblement réversible est observé vers -0,2 V indiquant la présence d'HRP connectée directement. Ces mêmes électrodes ont ensuite été étudiées en présence de substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 1 mM dans PBS pH 7,4 à 25°C.



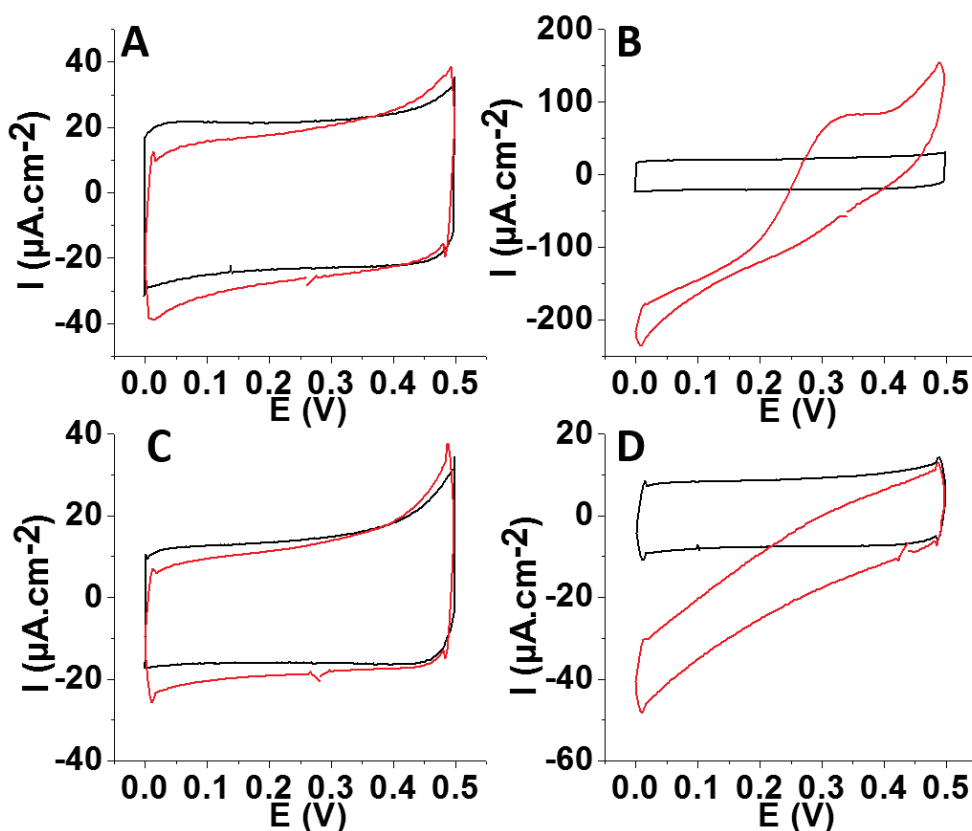


Figure IV.10 : Figure : CV des électrodes fonctionnalisées A) MWCNTs/HRP, B) MWCNTs/Pyrène1/HRP, C) MWCNTs/Pyrène2/HRP et D) MWCNTs/Pyrène3/HRP en l'absence (courbes noires) et présence (courbes rouges) de 1 mM de  $H_2O_2$  dans PBS pH 7,4 à 25°C ( $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$ )

En accord avec les résultats obtenus précédemment, un fort courant catalytique est observé pour l'électrode MWCNTs/Pyrène1/HRP à faible surtension (Figure IV.10B). En revanche, l'électrode fonctionnalisée par le pyrène 2 présente un courant de réduction de  $H_2O_2$  négligeable, tout comme le témoin MWCNTs/HRP (Figure IV.10A et C). Enfin, l'électrode fonctionnalisée par couplage peptidique entre le pyrène 3 et les résidus amines primaires de la HRP permet d'obtenir un courant catalytique de réduction moins important que celle étant fonctionnalisée par le pyrène 1 (Figure IV.10B et D). Le potentiel auquel la réduction de  $H_2O_2$  commence, en particulier pour MWCNTs/Pyrène1/HRP, est 0,42 V Vs SCE. Ce potentiel correspond à la formation des espèces  $Fe^{IV}=O^{\bullet-}$  et  $Fe^{IV}=O$  (composés I et II) se situant environ à 0,65 V Vs SCE<sup>29</sup>. La différence entre la valeur obtenue et les valeurs « théoriques » s'explique par la compétition qu'il existe entre la réduction et l'oxydation de  $H_2O_2$  à l'électrode. En effet l'oxydation electrocatalytique de  $H_2O_2$  apparait clairement sur la partie anodique de la CV autour de 0,25 V (Figure IV.10B).

Des mesures de chronoampérométrie ont également été réalisées à 0,2 V pour suivre l'évolution du courant catalytique en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène (Figure IV.11).

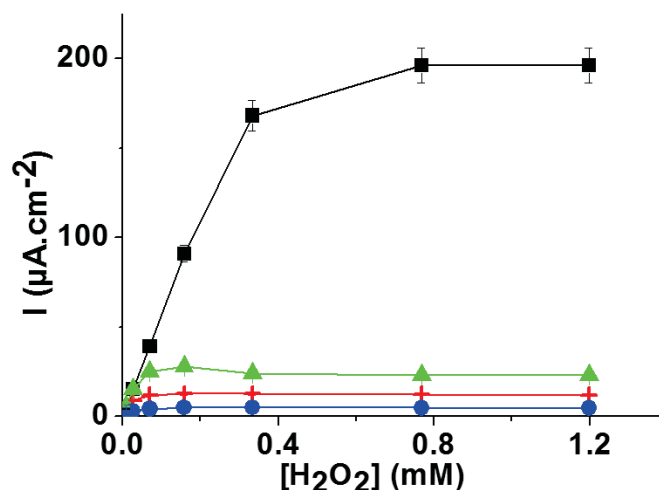


Figure IV.11 : chronoampérométrie à 0,2 V avec additions successives de  $\text{H}_2\text{O}_2$  des électrodes MWCNTs fonctionnalisées par Pyrène1/HRP (courbe noire), Pyrène2/HRP (courbe rouge), Pyrène3/HRP (courbe verte) et HRP seule (courbe bleue) dans PBS pH 7,4 à 25°C ( $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$ )

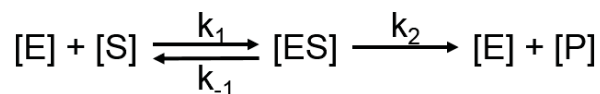
Pour l'électrode fonctionnalisée avec le Pyrène 1, les courants catalytiques atteignent une valeur maximale de  $196 \mu\text{A.cm}^{-2}$  à une concentration de 0,8 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le  $K_M^{\text{app}}$  obtenu par électrocatalyse à 0,2 V, mesuré graphiquement, est de 0,2 mM pour cette électrode.

Electrode	$I_{\text{MAX}} (\mu\text{A.cm}^{-2})$	$K_M^{\text{app}} (\text{mM})$
MWCNTs seuls	5	0.01
MWCNTs/Pyrene 1	196	0.2
MWCNTs/Pyrene 2	14	0.015
MWCNTs/Pyrene 3	28	0.025

Tableau 1

Le Tableau 1 récapitule les courants  $I_{\text{MAX}}$  obtenus et les  $K_M^{\text{app}}$  relevés graphiquement pour les 4 types d'électrodes étudiées. La bioélectrode modifiée par le dérivé pyrène 1 mène à l'obtention des courants catalytiques de réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  les plus importants avec  $196 \mu\text{A.cm}^{-2}$ . En comparaison, l'électrode fonctionnalisée avec Pyrène 2 possédant un espaceur plus grand ne délivre qu'un faible courant de l'ordre de  $12 \mu\text{A.cm}^{-2}$ . Celle portant le pyrène 3 permet d'obtenir  $28 \mu\text{A.cm}^{-2}$ , montrant les propriétés moins intéressantes d'électrocatalyse de ces électrodes. L'électrode basée sur l'adsorption non spécifique d'HRP sur MWCNTs seuls permet d'obtenir des courants également négligeables de l'ordre de  $5 \mu\text{A.cm}^{-2}$ . L'adsorption non spécifique de la HRP ne permet pas de connecter la HRP directement de manière efficace. Les valeurs de courants catalytiques  $I_{\text{MAX}}$  semblent augmenter avec la valeur de  $K_M^{\text{app}}$  pour chaque électrode. Pour les 4 bioélectrodes, ce  $K_M$  est inférieur aux valeurs décrites dans la littérature pour l'enzyme en solution avec l'ABTS qui varient de 0,44 mM<sup>55</sup> à 0,23 mM<sup>56</sup>. L'électrode modifiée par le dérivé pyrène 1, qui permet l'obtention des meilleurs courants catalytiques,

présente le  $K_M^{app}$  le plus proche de ces valeurs. Pour autant, il est difficile de comparer le  $K_M^{app}$  obtenu avec des électrodes fonctionnant par transfert direct d'électron et le  $K_M$  obtenu avec l'enzyme libre en solution avec l'ABTS comme co-substrat. Le modèle de Michaelis-Menten est en effet basé sur la réaction de type :



Dans cette équation, la première étape consistant en l'association de  $H_2O_2$  avec l'hème de la HRP est commune au cas de l'enzyme en solution et de l'enzyme connectée à l'électrode. En revanche, la seconde étape, permettant l'obtention du produit a pour constante cinétique  $k_2$  qui est fonction du mécanisme de régénération du biocatalyseur. Dans un cas, l'enzyme est régénérée par le co-substrat l'ABTS ou par le transfert direct d'électron.

L'expression du  $K_M$  fait intervenir les constantes cinétiques des deux étapes:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Cette équation met en évidence que le  $K_M$  sera différent si la seconde partie de la réaction enzymatique est différente puisque  $k_2$  sera différent.

Afin de déterminer la quantité d'enzymes immobilisée sur la surface ainsi que d'évaluer l'influence du transfert électronique sur le processus de réduction de  $H_2O_2$  en fonction de la taille de l'espaceur, les activités enzymatiques des électrodes MWCNTs/Pyrène1/HRP et MWCNTs/Pyrène2/HRP ont été évaluées par méthode spectrophotométrique. L'activité de l'enzyme en solution et sur les bio-électrodes a été mesurée par le suivi de l'apparition du radical cation de l'acide 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS<sup>•+</sup>) à 415 nm sous air et en présence de  $H_2O_2$ .

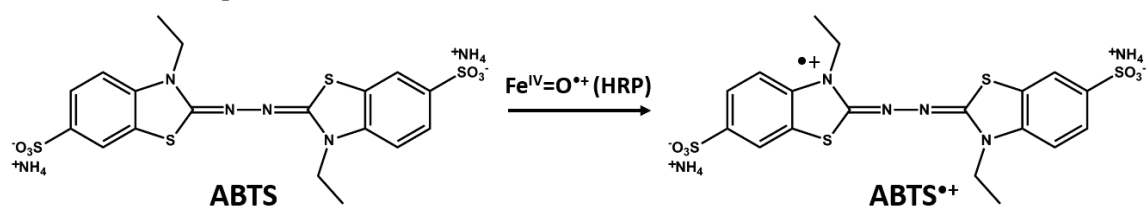


Figure IV.12 : Réaction d'oxydation de l'ABTS en ABTS<sup>•+</sup> enzymatique par l'hème de la HRP en présence d' $H_2O_2$

L'ABTS est un médiateur connu de la HRP, sous sa forme réduite il est capable de transférer un électron à la HRP pour former le radical cation ABTS<sup>•+</sup> absorbant à 415 nm. L'activité de la HRP peut donc être calculée par UV-visible en suivant l'apparition de la bande à 415 nm tout en faisant l'approximation que l'activité de l'enzyme immobilisée est la même que celle en solution. La comparaison des activités relevées indique que 46  $\mu g.cm^{-2}$  et 22  $\mu g.cm^{-2}$  d'enzymes ont été immobilisées sur les électrodes de MWCNTS fonctionnalisées par Pyrène 1 et Pyrène 2 respectivement (Figure IV.13).

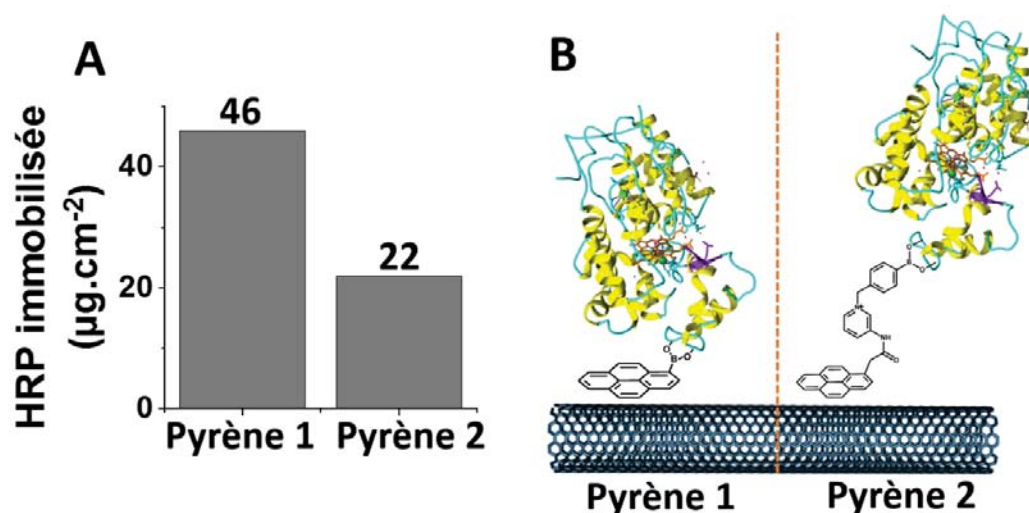


Figure IV.13 : A) quantité d'enzymes immobilisées calculée par mesure de l'activité enzymatique de chaque électrode Pyrène 1 et Pyrène 2 par UV-Vis en présence d'ABTS B) Schéma de la HRP immobilisée sur électrodes de MWCNTs fonctionnalisées par les dérivés Pyrène 1 et Pyrène 2

Par rapport au Pyrène 2, le dérivé sans espaceur 1 permet d'immobiliser plus de deux fois plus d'enzymes sur la surface des MWCNTs. La HRP, possédant un point isoélectrique (pI) de 8,8, est globalement chargée positivement lors des incubations et des mesures électrocatalytiques. La présence d'une charge positive (ion pyridinium) sur le dérivé pyrène 2 peut donc avoir un effet répulsif vis-à-vis de la protéine, expliquant en partie pourquoi la quantité de HRP immobilisée par ce dérivé est plus faible. Il est à noter aussi que la surface théorique (géométrique) occupée par une monocouche de HRP correspond à  $3,3 \text{ pmol.cm}^{-2}$ <sup>57</sup>. En prenant en compte poids moléculaire de la HRP utilisée (44 kDa), la valeur de  $46 \text{ µg.cm}^{-2}$  d'enzymes immobilisées sur électrode de MWCNTs/Pyrène1/HRP mesurée précédemment équivaut à environ 318 monocouches de HRP, illustrant le caractère tridimensionnel de la matrice de MWCNTs ainsi que l'excellente propriété d'ancrage de l'électrode fonctionnalisée par le dérivé 1.

En utilisant les propriétés de médiateur rédox de l'ABTS vis-à-vis de la HRP, la réponse électrocatalytique des deux types d'électrodes a également été étudiée par chronoampérométrie à 0,2 V en présence de 6 mM d'ABTS et de 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure IV.14).

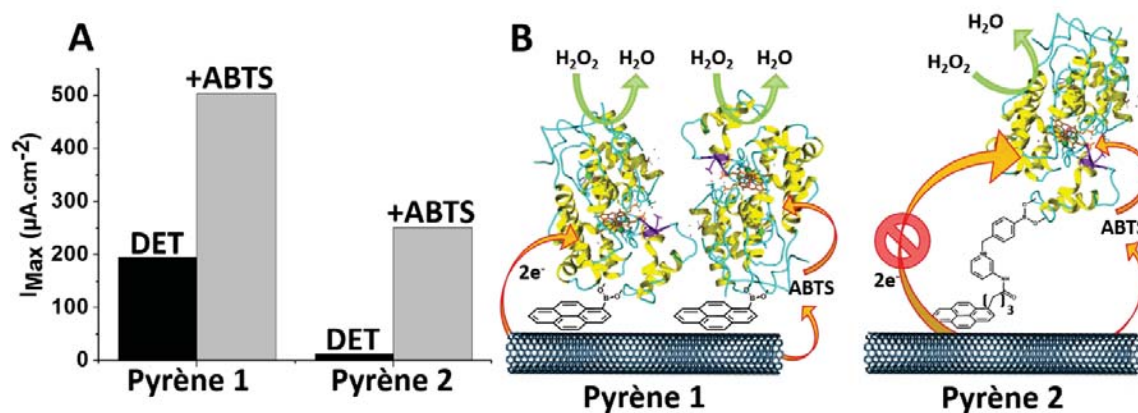


Figure IV.14 : A) courants maximum obtenu par chronoampérométrie à 0,2V en présence de 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  avant et après addition de 6 mM de ABTS pour les électrodes de MWCNTs fonctionnalisées par Pyrène1/HRP et Pyrène2/HRP (PBS 0,1 M, pH 7,4, 25°C) B) Représentation schématique des mécanismes des transferts électroniques par DET et/ou MET avec ABTS observés à chaque électrode de MWCNTs fonctionnalisées par Pyrène1/HRP et Pyrène2/HRP

La comparaison des courants obtenus ( $504 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  avec pyrène 1 et  $252 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  avec pyrène 2) en présence d'ABTS confirme l'immobilisation d'un plus grand nombre de protéine sur l'électrode de MWCNTs portant le monomère Pyrène 1. Avec ce dernier, le courant obtenu en présence d'ABTS est de  $504 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  contre  $196 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  par transfert direct. L'obtention d'un courant 2,5 fois plus important prouve que les HRP ne sont néanmoins pas toutes connectées directement à la matrice de nanotubes. En faisant l'hypothèse que le DET et le MET ont des cinétiques comparables, il est alors possible d'affirmer qu'environ 40% des protéines immobilisées sur CNTs sont connectées directement à l'électrode. La même expérience a été menée pour l'électrode MWCNTs/Pyrène2/HRP et le courant maximal en présence d'ABTS a atteint  $252 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Par la même approximation que précédemment, ceci indique que seulement 5% des enzymes accrochées sur la surface sont capables d'effectuer un transfert électronique direct avec les CNTs.

Toutes ces expériences confirment les excellentes propriétés d'ancrage des fonctions acide boronique pour les dérivés glycosylés. La nature de l'espaceur a également un rôle crucial. En effet, un espaceur de courte taille minimise la distance entre le site actif de l'enzyme et la surface des CNTs permettant ainsi un transfert favorisé d'électron. Un bras plus long a pour effet au contraire d'éloigner le site actif de l'électrode réduisant donc les chances de transfert électronique protéine-électrode. En outre, dans le cas du Pyrène2, il se peut que la charge positive située au niveau de l'azote du groupement pyridinium ait un effet répulsif. Le point isoélectrique de la HRP étant de l'ordre de 8,8, la charge globale de la protéine à pH inférieur à 8,8 est donc positive. Ceci peut expliquer la différence de quantité d'enzyme immobilisée pour les deux monomères à bras court et long.

### IV.3 Cathode bi-enzymatique GOx-HRP

En tirant avantage de l'excellent transfert direct entre les MWCNTs fonctionnalisés par le pyrène 1 et la HRP, un système bi-enzymatique GOx-HRP a été élaboré afin de réaliser la réduction de  $O_2$  en  $H_2O$  à des potentiels rédox élevés grâce à la production de  $H_2O_2$  à l'anode par la GOx en présence de glucose.

Les électrodes MWCNTs/Pyrène1 sont ainsi incubées dans un mélange équimolaire de GOx et de HRP (Figure IV.15A).

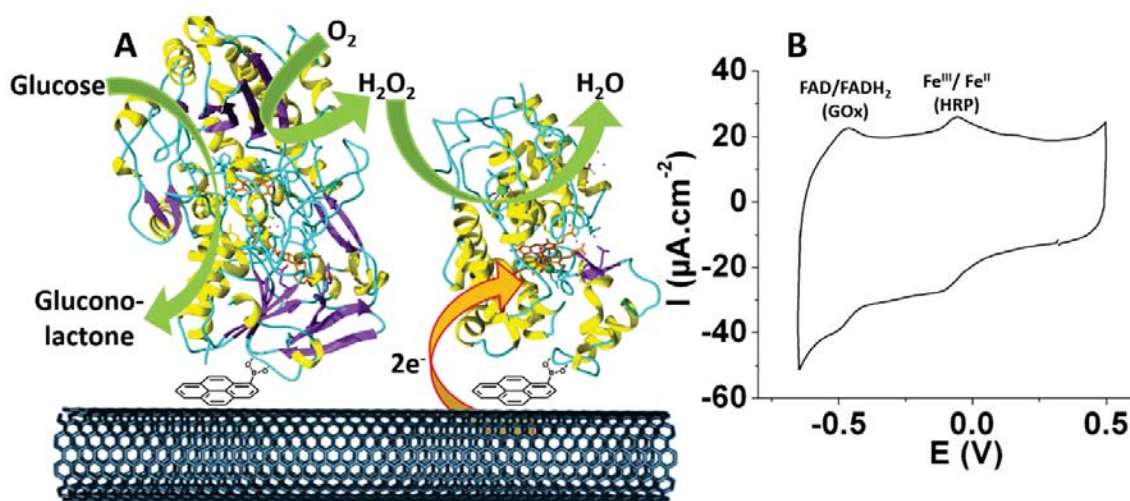


Figure IV.15: A) Représentation schématique de fonctionnement catalytique de l'électrode MWCNTs/Pyrène 1 fonctionnalisée par le système bi-enzymatique GOx-HRP B) CV de l'électrode MWCNTs/Pyrène1 après incubation dans une solution contenant un mélange équimolaire de GOx-HRP à  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans PBS 0,1 M, pH 7,4 à  $25^\circ\text{C}$  ( $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$ )

La CV de la bio-cathode bi-enzymatique présente très clairement deux systèmes de pics rédox réversibles. Le premier se trouve à  $E_{1/2} = -0,08$  V Vs SCE ( $\Delta E = 50$  mV) et le deuxième à  $E_{1/2} = -0,48$  V Vs SCE ( $\Delta E = 40$  mV) (Figure IV.15B). Ces deux systèmes correspondent aux potentiels rédox du  $Fe^{III}/Fe^{II}$  de la HRP et à  $FAD/FADH_2$  de la GOx. Comme précédemment, l'excellente réponse électrochimique du système  $Fe^{III}/Fe^{II}$  appartenant au site actif de la HRP atteste de sa bonne immobilisation sur la surface des MWCNTs grâce à la formation d'un ester boronique avec le dérivé Pyrène 1. La réponse du couple  $FAD/FADH_2$  est à relativiser puisqu'il pourrait s'agir de FAD libres, hors de la protéine, également capable de former un ester boronique grâce à la présence du résidu osidique sur la FAD comme cela a été démontré par Willner et al<sup>58</sup>.

En présence de glucose (5 mM), la GOx oxyde le glucose en acide gluconique tout en réduisant  $O_2$  en  $H_2O_2$ . Notons que du fait des faibles cinétiques de connexion de la GOx pour l'électrooxydation du glucose, aucun courant catalytique d'oxydation du glucose n'a été observé, pouvant éventuellement perturber l'électroréduction de  $H_2O_2$ . Le  $H_2O_2$  produit par la



GOx est alors réduit en H<sub>2</sub>O par la HRP, ce qui donne lieu à l'obtention d'un courant catalytique de réduction. La vague catalytique apparaît à partir de 0,43 V (Figure IV.16A).

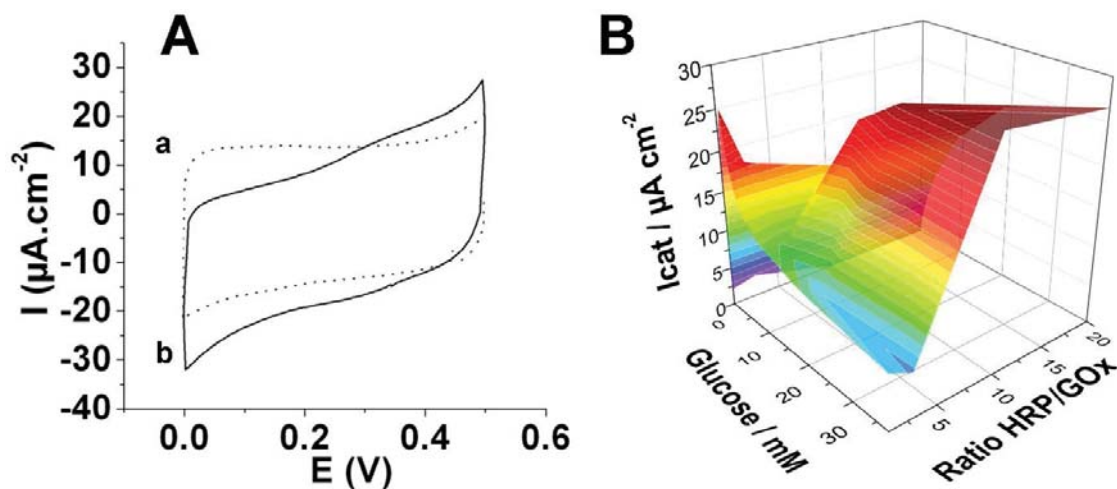


Figure IV.16: A) CV de l'électrode MWCNTs/Pyrène1 fonctionnalisée par un ratio 1-10 HRP/GOx en absence (pointillés) et présence (trait plein) de 5 mM de glucose dans PBS 0,1 M, pH 7,4 à 37°C ( $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) B) Evolution du courant catalytique de réduction de O<sub>2</sub> en fonction de la concentration de glucose et des ratios HRP/GOx réalisés (1/1 ; 3/1 ; 10/1 ; 20/1) ( $E_{\text{app}} = 0,2 \text{ V}$ , PBS 0,1 M, pH 7,4, 37°C)

Dans le but d'optimiser les propriétés catalytiques du système bi-enzymatique, les électrodes de MWCNTs fonctionnalisées par le Pyrène 1 ont été incubées dans des solutions de PBS contenant différents ratios de concentration de GOx et HRP. Ces bio-électrodes ont ensuite été étudiées par chronoampérométries à 0,2 V afin de suivre l'évolution du courant catalytique produit en fonction de la concentration de glucose ajoutée dans PBS 0,1 M, pH 7,4 à 37°C (Figure IV.16B). En fonction des ratios HRP/GOx, différentes propriétés catalytiques de la bio-cathode bi-enzymatique ont pu être observées (Tableau 2).

Ratios HRP/GOx	$I_{\text{MAX}} (\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2})$	$I (\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2})$	$K_{\text{M}}^{\text{app}}$
		à [glu] = 5 mM	Bienzymatique (mM)
1/1	25 à 0,8 mM	13	0,08
3/1	19 à 1,7 mM	12	0,26
10/1	28 à 37 mM	17	3,26
20/1	30 à 80 mM	11	8

Tableau 2



Le Tableau 2 présente les  $I_{MAX}$ , les courants catalytiques à 5 mM de glucose ainsi que les valeurs de  $K_M^{app}$  mesurés graphiquement obtenus pour chaque ratio de HRP/GOx.

On observe très clairement que pour de faibles ratios HRP/GOx (1/1 et 3/1), les courants catalytiques maximums sont obtenus à de plus faibles concentrations en glucose et que, dans un second temps, les courants diminuent avec l'augmentation de la concentration en glucose. Ceci peut s'expliquer par une surproduction locale de  $H_2O_2$  par la GOx ayant pour effet de saturer puis inhiber la HRP. Inversement, à haut ratio HRP/GOx, le grand nombre de HRP connectées directement contrebalance la production de  $H_2O_2$  par la GOx. Dans ce cas, l'activité catalytique augmente avec la concentration en glucose dans la solution jusqu'à atteindre un courant maximum de  $28 \mu A.cm^{-2}$  à 37 mM de glucose pour le ratio 10/1. Comme précédemment, on remarque également que les courants catalytiques semblent également augmenter avec le  $K_M$ . Cependant, dans le cas de ces bioélectrodes bienzymatiques, il est d'autant plus compliqué de rationaliser cette valeur puisqu'elle est mesurée par la réponse électrocatalytique de la HRP sur électrode qui dépend de la concentration de  $H_2O_2$  et donc directement de la concentration de glucose et de la quantité de GOx immobilisée sur l'électrode. Cependant, cette étude souligne l'excellent contrôle d'une part de l'immobilisation de différentes enzymes à travers la formation d'un lien ester boronique et d'autre part du mécanisme compliqué de réduction de l'oxygène par le système bi-enzymatique. La configuration du système bi-enzymatique pour un fonctionnement optimal en milieu physiologique (5 mM de glucose, 0,14 mM de NaCl) a pu être déterminée. Le ratio idéal HRP/GOx pour ces conditions est de 10/1 et a permis d'obtenir une densité de courant de  $17 \mu A.cm^{-2}$ . Ce ratio élevé est un compromis nécessaire pour connecter un maximum de HRP et limiter la surproduction de  $H_2O_2$  par la GOx, entraînant l'inhibition de la HRP.

Cette biocathode est donc particulièrement attrayante dans l'optique d'un fonctionnement *in vivo*. En revanche, la stabilité de la bioélectrode, seulement 10% de catalyse restante après un jour, n'est pas satisfaisante pour permettre l'élaboration de biopiles stables dans le temps. La méthode de greffage par formation d'un ester boronique peut en effet poser certains problèmes en termes de stabilité. En effet, ce lien ester boronique peut être clivée en conditions acides et oxydantes. Les dérivés acides boroniques sont connus pour leur grande affinité pour les substrats osidiques et dans cette étude c'est précisément la formation de l'ester boronique entre la surface fonctionnalisée et la protéine glycosylée qui permet une immobilisation efficace de l'enzyme. Cependant, lorsque la biocathode est sensée fonctionner en présence de glucose, la présence de ce sucre peut engendrer le clivage du lien boronique entre le pyrène et la protéine au profit du saccharide.

## IV.4 Application de la biocathode GOx-HRP à une biopile glucose-O<sub>2</sub>

Afin d'améliorer les courants catalytiques produit par la biocathode HRP/GOx en réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> les bioélectrodes ont été élaborées par dépôt de 20 µL d'une dispersion de MWCNTs dans le NMP sur une électrode plane de feutre de carbone flexible (comme dans le chapitre 3 avec l'anode GDH et la cathode BOD) et en utilisant un ratio HRP/GOx égal à 10. Le dépôt sur feutre de carbone induit une rugosité plus importante du film de MWCNTs déposé, ce qui a pour effet d'accroître la surface spécifique d'accroche des biomolécules avec une électrode de volume similaire. Les électrodes sont finalement de 0,2 cm<sup>2</sup> et le dépôt de CNTs d'une épaisseur de 5 µm. La biocathode HRP/GOx élaborée dans ces conditions a été testée indépendamment, afin de connaître ses propriétés d'électroréduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en milieu physiologique (Figure IV.17).

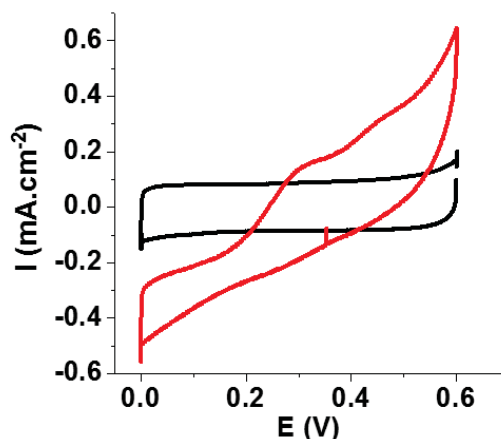


Figure IV.17 : CV de la biocathode HRP/GOx sur MWCNTs/Pyrène 1 déposé sur feutre de carbone en absence (courbe noire) et présence de 5 mM de glucose dans PBS pH 7,4 à 37°C et sous air ( $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Comme pour les autres biocathodes élaborées dans la partie IV.3, la bioélectrode élaborée sur feutre de carbone présente une vague de réduction électrocatalytique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> commençant à 0,43 V en présence de 5 mM de glucose, à pH 7,4 et à 37°C. Cependant, par rapport aux électrodes élaborées par transfert de film de MWCNTs présentées précédemment, la valeur du courant catalytique obtenu est beaucoup plus importante. Ceci peut s'expliquer par la plus large surface spécifique du dépôt, qui est 1 µm plus épais que précédemment, et de la nature plus rugueuse de ce dernier déposé sur le feutre de carbone. Ceci a donc pour effet de permettre une fonctionnalisation plus efficace par le dérivé pyrène 1 et, par conséquent, l'immobilisation d'un plus grand nombre d'enzymes à la surface de l'électrode. Avec ce type d'électrode, la valeur du courant catalytique obtenu est d'environ 200 µA.cm<sup>-2</sup> contre seulement 15 µA.cm<sup>-2</sup> dans le cas d'une électrode élaborée par transfert de film.

La biocathode HRP/GOx présente donc de nombreux intérêts pour la conception de biopile glucose- $O_2$ . Cependant, à l'heure actuelle, l'association de ces deux enzymes est encore très minoritaire par rapport aux biocathodes à MCOs. Ceci s'explique par les performances catalytiques plus faibles de ces cathodes par rapport aux meilleures cathodes décrites par utilisation de MCOs. Pour le moment, très peu d'études ont présentées l'utilisation de ces biocathodes dans une biopile complète glucose- $O_2$ . En 2013, nous avons présenté l'élaboration de la première biopile enzymatique à glucose- $O_2$  basée sur la réduction de  $H_2O_2$  produit par la GOx à la cathode par connexion directe de la HRP sur nanotubes de carbone double paroi (DWCNTs)<sup>18</sup>. Cette pile, basée sur la connexion indirecte de la GOx sur DWCNTs par la 1,4-NQ à l'anode, a permis de délivrer une puissance maximale de  $30 \mu W.cm^{-2}$  à 0,3 V avec une f.e.m de 0,45 V dans les conditions physiologiques (pH 7,4, 5 mM de glucose, 150 mM de NaCl, à 37°C et sous air). L'autre exemple a été décrit quelques mois plus tard par le groupe de Ramanavicius qui a élaboré une biopile similaire sur graphite<sup>59</sup>. Leur biopile basée sur une cathode GOx/HRP en DET et sur une anode GOx médiée par la 5-aminophénanthroline quinone a permis d'obtenir une puissance maximale de  $3,5 \mu W.cm^{-2}$  à 0,3 V avec une f.e.m de 0,45 V. La pile s'est avérée stable pendant une dizaine de jours mais l'étude n'était pas conduite en milieu physiologique.

Dans cette même optique de réaliser une biopile glucose- $O_2$  opérationnelle dans les conditions physiologiques nous avons choisi de coupler la biocathode HRP/GOx présentée précédemment avec une bioanode à base de GDH  $NAD^+$ -dépendante décrite dans le chapitre 3. La bioanode basée sur la modification supramoléculaire des MWCNTs par le dérivé RuQ-pyrène s'étant avéré la plus efficace pour obtenir de forts courants d'oxydation du glucose, c'est cette anode qui a été choisie.

*Afin de constituer une biopile fonctionnant grâce à la catalyse d'oxydation du glucose à l'anode et la catalyse de la réduction de  $O_2$  via l'oxydation du glucose à la cathode, la bioélectrode HRP/GOx (ratio 10 :1) présentée précédemment a été combinée avec l'anode MWCNTs/RuQ-pyrène/pyrène-pyrène/pyrène-NHS/GDH présentée dans le chapitre 3 (*

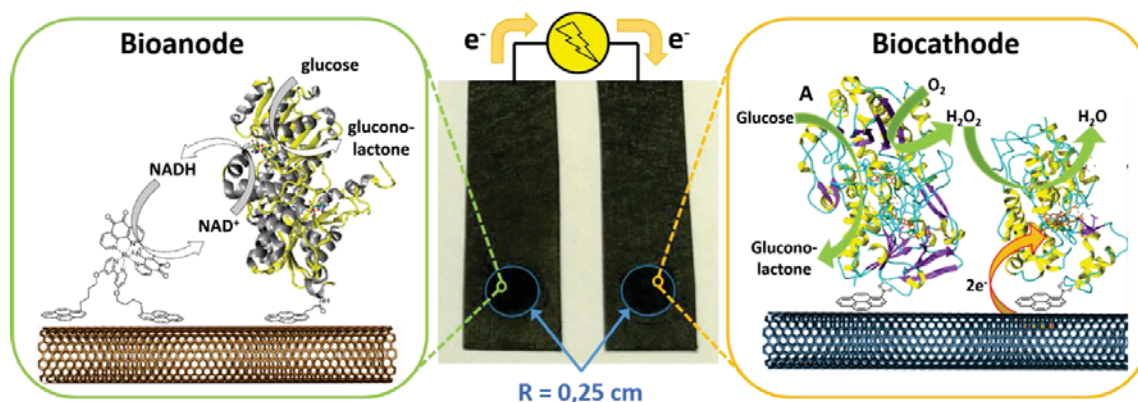


Figure IV.18).

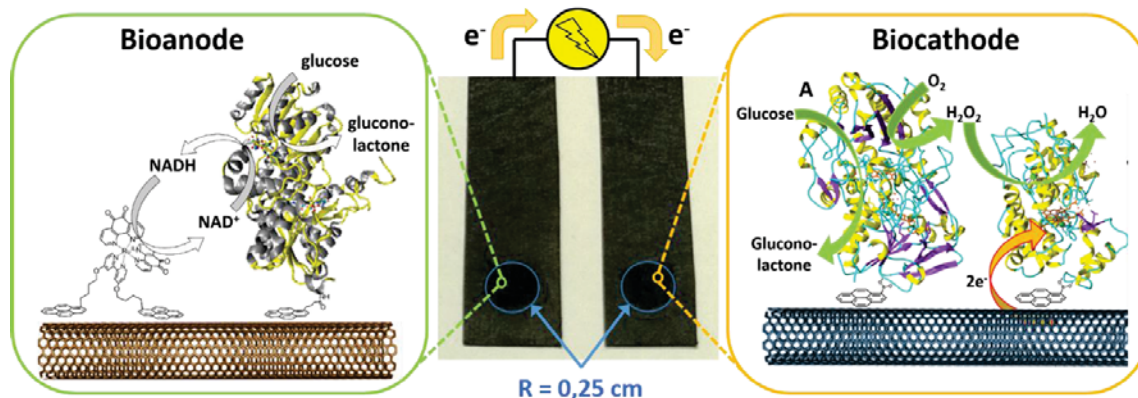


Figure IV.18 : clichée du dépôt de MWCNTs fonctionnalisation de la bioanode à droite et de la biocathode à gauche avec les représentations schématiques des processus électrocatalytiques à chaque bioélectrode

La biopile a été caractérisée par mesure de chronoampérométrie à différents potentiels, à partir de son potentiel d'abandon (Figure IV.19A).

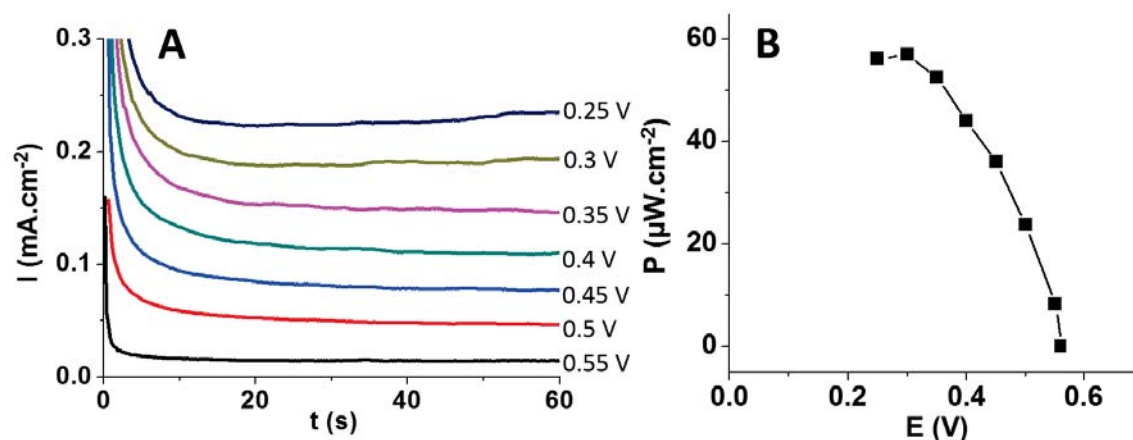


Figure IV.19 : A) décharge par chronoampérométrie à 0,55 ; 0,5 ; 0,45 ; 0,4 ; 0,35 ; 0,3 et 0,25 V de la biopile GDH-HRP/GOx en présence de 5 mM de glucose, 10 mM de NAD<sup>+</sup>, 150 mM NaCl à pH 7,4, 37°C B) courbe de puissance de la biopile GDH-HRP/GOx obtenue après décharge par chronoampérométrie en présence de 5 mM de glucose, 10 mM de NAD<sup>+</sup>, 150 mM NaCl à pH 7,4, 37°C

La biopile présente une f.e.m de l'ordre de 0,55 V correspondant parfaitement à la différence de potentiel des deux bioélectrodes en présence de substrat, soulignant en particulier le fait que la présence de NAD<sup>+</sup> n'impacte pas les performances de la biocathode. Les décharges effectuées à potentiel constant permettent de s'apercevoir que les courants catalytiques délivrés par la biopile se stabilisent rapidement. Ces courants obtenus par chronoampérométrie permettent de remonter à la puissance de la pile à chaque valeur de potentiel. La biopile GDH-

HRP/GOx délivre une puissance maximale de  $57 \mu\text{W.cm}^{-2}$  à 0,3 V. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils sont obtenus dans des conditions restrictives proches de celles du milieu physiologique (hormis la présence de  $\text{NAD}^+$ ) et la biopile délivre des puissances supérieures aux travaux antérieurs<sup>18,59</sup>.

## IV.5 Conclusions

Ce chapitre est axé sur l'élaboration d'une biocathode formée d'un système bienzymatique HRP/GOx pour la réduction en deux étapes, enzymatique puis électroenzymatique, du dioxygène comme alternative à l'utilisation des enzymes à cuivre.

La première partie est focalisée sur l'optimisation de la connexion directe de la HRP sur électrode de MWCNTs. Par modification non covalente des CNTs avec des dérivés pyrènes porteurs de fonctions d'ancrages différentes, la capacité de ces derniers à permettre un bon transfert électronique direct entre la matrice de CNTs et la protéine a pu être évaluée. Notamment, la méthode de greffage par les dérivés 1 et 2 tire avantage de la formation d'un ester boronique par réaction de l'acide boronique avec les résidus glycosylés de la protéine. Le dérivé le plus intéressant pour l'immobilisation et la connexion de l'enzyme s'est avéré être le pyrène porteur d'une fonction acide boronique sans espaceur par rapport au pyrène 2 et 3. Par l'intermédiaire de ce dérivé, la HRP a donc pu être efficacement connectée et a permis de délivrer des courants d'électroréduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{A.cm}^{-2}$  à haut potentiels.

Dans un second temps, afin d'élaborer une biocathode permettant la réduction de  $\text{O}_2$  en deux étapes, l'élaboration d'une électrode incorporant la GOx pour la réduction de  $\text{O}_2$  en présence de glucose et la HRP en DET pour la réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été envisagée. Grâce au pyrène 1 et les dérivés osidiques présents sur les deux enzymes rédox, la co-immobilisation de la GOx et de la HRP a pu être réalisée. Différents ratios de fonctionnalisation par ces deux protéines ont été testés pour permettre d'optimiser la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la GOx en vue de son électroréduction par la HRP en présence de 5 mM de glucose dans le but de se rapprocher des conditions physiologiques. Le meilleur ratio HRP/GOx a été évalué à 10/1. Au-delà, la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit par la GOx n'est pas suffisante à 5 mM de glucose. A l'inverse, pour de faibles ratios, la quantité de peroxyde d'hydrogène est trop importante et détériore les performances de la biocathode. A ce ratio 10/1, les courants catalytiques obtenus ont été de  $15 \mu\text{A.cm}^{-2}$  à 0,2 V en conditions proches physiologiques.

Enfin, l'intégration de la biocathode HRP/GOx au sein d'une biopile glucose- $\text{O}_2$  en association avec une pile à base de GDH  $\text{NAD}^+$ -dépendante présenté dans le chapitre 3 a été envisagée. Les

surfaces de MWCNTs ont été déposées sur feutre de carbone, améliorant les propriétés surfacique du film de CNTs. Dans ces conditions, les courants catalytiques délivrés par la biocathode au ratio 10/1 ont été de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$ . Associée à l'anode MWCNTs/RuQ-pyrène/pyrène-NHS/GDH présentée dans le chapitre précédent, cette biocathode a permis l'élaboration d'une biopile glucose- $\text{O}_2$  fonctionnelle en conditions physiologique avec l'ajout de  $\text{NAD}^+$  en solution. Cette pile a permis l'obtention d'une puissance maximale de  $57 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$  à 0,3 V avec une f.e.m de 0,55 V.

Les caractéristiques de cette biocathode fonctionnelles en condition physiologique rendent ce dispositif adapté à un fonctionnement in vivo. Cependant, l'instabilité de la bioélectrode doit auparavant être améliorée. L'association de cette technique de greffage en parallèle avec la formation de liens covalents plus stables devrait permettre d'obtenir de meilleures stabilités dans le temps.

Aussi, l'optimisation des surfaces d'électrodes de MWCNTs utilisées pour le greffage et la connexion des protéines devrait également pouvoir permettre d'améliorer les propriétés catalytiques de ce type de biocathodes.



1. M. Falk, Z. Blum, and S. Shleev, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 191–202.
2. D. Leech, P. Kavanagh, and W. Schuhmann, *Electrochimica Acta*, 2012, **84**, 223–234.
3. W. Zheng, Q. Li, L. Su, Y. Yan, J. Zhang, and L. Mao, *Electroanalysis*, 2006, **18**, 587–594.
4. R. P. Ramasamy, H. R. Luckarift, D. M. Ivnitski, P. B. Atanasov, and G. R. Johnson, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6045.
5. C. Gutiérrez-Sánchez, W. Jia, Y. Beyl, M. Pita, W. Schuhmann, A. L. De Lacey, and L. Stoica, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 218–223.
6. N. Mano and L. Edembe, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **50**, 478–485.
7. S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, and L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 2517–2554.
8. S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas, and L. Gorton, *Bioelectrochemistry*, 2005, **67**, 115–124.
9. S. C. Barton, M. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, and A. Heller, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**, 1071–1074.
10. R. D. Milton, F. Giroud, A. E. Thumser, S. D. Minter, and R. C. T. Slade, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 19371–19379.
11. C. Kang, H. Shin, Y. Zhang, and A. Heller, *Bioelectrochemistry*, 2004, **65**, 83–88.
12. C. Kang, H. Shin, and A. Heller, *Bioelectrochemistry*, 2006, **68**, 22–26.
13. C. Vaz-Dominguez, S. Campuzano, O. Rüdiger, M. Pita, M. Gorbacheva, S. Shleev, V. M. Fernandez, and A. L. De Lacey, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, **24**, 531–537.
14. N. Lalaoui, K. Elouarzaki, A. L. Goff, M. Holzinger, and S. Cosnier, *Chem. Commun.*, 2013.
15. L. Edembe, S. Gounel, M. Cadet, F. Durand, and N. Mano, *Electrochem. Commun.*, 2012, **23**, 80–82.
16. W. Jia, S. Schwamborn, C. Jin, W. Xia, M. Muhler, W. Schuhmann, and L. Stoica, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 10088–10092.
17. W. Jia, C. Jin, W. Xia, M. Muhler, W. Schuhmann, and L. Stoica, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 2783–2786.
18. C. Agnès, B. Reuillard, A. Le Goff, M. Holzinger, and S. Cosnier, *Electrochem. Commun.*, 2013, **34**, 105–108.
19. E. A. Veal, A. M. Day, and B. A. Morgan, *Mol. Cell*, 2007, **26**, 1–14.
20. M. Giorgio, M. Trinei, E. Migliaccio, and P. G. Pelicci, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, **8**, 722–728.
21. S. Neill, R. Desikan, and J. Hancock, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2002, **5**, 388–395.
22. M. Geiszt and T. L. Leto, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 51715–51718.
23. T. Finkel, *FEBS Lett.*, 2000, **476**, 52–54.



24. G. Wohlfahrt, S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H. M. Kalisz, and H.-J. Hecht, *Acta Crystallogr. Sect. D*, 1999, **55**, 969–977.
25. V. Leskovac, S. Trivić, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, and D. Peričin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, **37**, 731–750.
26. T. Finkel and N. J. Holbrook, *Nature*, 2000, **408**, 239–247.
27. K. Apel and H. Hirt, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004, **55**, 373–399.
28. W. Adam, M. Lazarus, C. R. Saha-Möller, O. Weichold, U. Hoch, D. Häring, and P. Schreier, in *Biotransformations*, ed. P. D. K. Faber, Springer Berlin Heidelberg, 1999, pp. 73–108.
29. G. Battistuzzi, M. Bellei, C. A. Bortolotti, and M. Sola, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, **500**, 21–36.
30. T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton, and G. Marko-Varga, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **330**, 123–138.
31. M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, and T. L. Poulos, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 1997, **4**, 1032–1038.
32. G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, and J. Hajdu, *Nature*, 2002, **417**, 463–468.
33. J. N. Rodríguez-López, D. J. Lowe, J. Hernández-Ruiz, A. N. P. Hiner, F. García-Cánovas, and R. N. F. Thorneley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 11838–11847.
34. Y. Hayashi and I. Yamazaki, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 9101–9106.
35. P. A. Adams and R. D. Gould, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, 97–98.
36. Z. S. Farhangrazi, M. E. Fossett, L. S. Powers, and W. R. Ellis, *Biochemistry (Mosc.)*, 1995, **34**, 2866–2871.
37. E. E. Ferapontova, *Electroanalysis*, 2004, **16**, 1101–1112.
38. A. I. Yaropolov, M. R. Tarasevich, and S. D. Varfolomeev, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1978, **5**, 18–24.
39. E. Suraniti, S. Ben-Amor, P. Landry, M. Rigoulet, E. Fontaine, S. Bottari, A. Devin, N. Sojic, N. Mano, and S. Arbault, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, n/a–n/a.
40. G. Jönsson and L. Gorton, *Electroanalysis*, 1989, **1**, 465–468.
41. E. Csöregi, G. Jönsson-Pettersson, and L. Gorton, *J. Biotechnol.*, 1993, **30**, 315–337.
42. E. E. Ferapontova, V. G. Grigorenko, A. M. Egorov, T. Borchers, T. Ruzgas, and L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, **16**, 147–157.
43. M. Sosna, D. Fapyane, and E. E. Ferapontova, *J. Electroanal. Chem.*, 2014, **728**, 18–25.
44. X. Kang, J. Wang, Z. Tang, H. Wu, and Y. Lin, *Talanta*, 2009, **78**, 120–125.
45. H. Chen and S. Dong, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 1811–1815.
46. Y.-D. Zhao, W.-D. Zhang, H. Chen, Q.-M. Luo, and S. F. Y. Li, *Sens. Actuators B Chem.*, 2002, **87**, 168–172.
47. J. Kim, H. Jia, and P. Wang, *Biotechnol. Adv.*, 2006, **24**, 296–308.

48. A. K. Sarma, P. Vatsyayan, P. Goswami, and S. D. Minteer, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 2313–2322.
49. M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, *Electrochimica Acta*, 2012, **82**, 179–190.
50. D. G. Hall, *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materials*, John Wiley & Sons, 2012.
51. Y. Egawa, T. Seki, S. Takahashi, and J. Anzai, *Mater. Sci. Eng. C*, 2011, **31**, 1257–1264.
52. B. Mu, T. P. McNicholas, J. Zhang, A. J. Hilmer, Z. Jin, N. F. Reuel, J.-H. Kim, K. Yum, and M. S. Strano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 17620–17627.
53. R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, and H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 3838–3839.
54. Z. Wu, Z. Chen, X. Du, J. M. Logan, J. Sippel, M. Nikolou, K. Kamaras, J. R. Reynolds, D. B. Tanner, A. F. Hebard, and A. G. Rinzler, *Science*, 2004, **305**, 1273–1276.
55. A. D. Ryabov, V. N. Goral, L. Gorton, and E. Csöregi, *Chem. – Eur. J.*, 1999, **5**, 961–967.
56. L. Fruk, J. Müller, and C. M. Niemeyer, *Chem. – Eur. J.*, 2006, **12**, 7448–7457.
57. B. Limoges, J.-M. Savéant, and D. Yazidi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9192–9203.
58. M. Zayats, E. Katz, and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14724–14735.
59. V. Krikstolaityte, Y. Oztekin, J. Kuliesius, A. Ramanaviciene, Z. Yazicigil, M. Ersoz, A. Okumus, A. Kausaite-Minkstimiene, Z. Kilic, A. O. Solak, A. Makaraviciute, and A. Ramanavicius, *Electroanalysis*, 2013, **25**, 2677–2683.



## **Conclusion générale**



Ce travail de recherche avait pour objectif d'optimiser la connexion électrique entre des enzymes rédox actives et des électrodes de nanotubes de carbone pour l'élaboration de biopiles glucose-O<sub>2</sub> performantes.

Après un chapitre de synthèse bibliographique, la deuxième partie de ce travail de thèse s'est concentrée sur le développement et la fabrication de bioélectrodes nanostructurées enzymatiques par compression mécanique, dans le but d'élaborer des biopiles glucose-O<sub>2</sub> pour des applications *in vivo* et l'alimentation de dispositifs électriques à faible demande énergétique. L'intégration d'une importante quantité d'enzymes dans une matrice de CNTs permet l'obtention de bioélectrodes stables et aisément manipulables en vue d'expériences d'implantation. La fabrication de bioanodes à base de GOx et d'un médiateur rédox incorporé à la matrice de CNTs, la 1,4-naphtoquinone, a permis d'assurer un transfert électronique indirect efficace entre la glucose oxydase (GOx) et l'électrode pour l'oxydation du glucose. En optimisant la diffusion du substrat à l'intérieur de la bioélectrode et en modulant la quantité de médiateur, des densités de courant de l'ordre de 3,25 mA.cm<sup>-2</sup> ont pu être obtenues. D'autres médiateurs de type quinone ont également été étudiés et la tentative d'immobilisation de deux d'entre eux pour améliorer la stabilité des bioélectrodes a conduit à la perte de leurs propriétés de médiation rédox. D'autres expériences sont en cours de réalisation.

Par le même procédé de compression mécanique, des biocathodes à base de deux différentes enzymes à cuivre, la laccase et la tyrosinase, ont été étudiées. Par ces expériences, nous avons mis en évidence pour la première fois, les propriétés de réduction de O<sub>2</sub> de la tyrosinase par transfert d'électron direct sur matrice de CNTs. Malgré les atouts de cette enzyme (activité à pH neutre, pas d'inhibition par Cl<sup>-</sup>), la connexion directe de la laccase reste la meilleure solution pour obtenir de fortes densités de courant de réduction de O<sub>2</sub> à haut potentiel de l'ordre de 3,3 mA.cm<sup>-2</sup> à 0,3 V Vs SCE.

Par assemblage des meilleurs bioélectrodes, une biopile glucose-O<sub>2</sub> a donc pu être élaborée. Cette biopile a permis l'obtention de puissances de l'ordre de 1,5 mW.cm<sup>-2</sup>. La possibilité, d'utiliser cette pile en décharges continues ou en décharges courtes discontinues a été étudiée. La possibilité de conserver une bonne stabilité après plusieurs mois de stockage dans différentes conditions a aussi été vérifiée. Cette biopile a également permis l'alimentation d'une diode pendant plusieurs dizaines de minutes.

Le troisième chapitre s'est focalisé sur la recherche d'alternatives à l'anode pour l'oxydation du glucose. La possibilité de concevoir une bioanode puissante à partir d'une glucose déshydrogénase (GDH) NAD<sup>+</sup>-dépendante a été envisagée. Dans cette optique, nous avons mis en évidence deux techniques de fonctionnalisation de films de CNTs par la GDH et par un catalyseur moléculaire de régénération de NAD<sup>+</sup> modifié par des fonctions d'ancrage.

La première méthode s'est basée sur l'encapsulation de la GDH au sein d'un métallopolymère original à base de complexes de ruthénium jouant le rôle à la fois de matrice pour l'enzyme et

à la fois de catalyseur d'oxydation de NADH. Cette méthode a permis de proposer une nouvelle espèce rédox électropolymérisable possédant d'excellentes propriétés de rétention enzymatique. De plus la bioanode formée, en présence de 10 mM de  $\text{NAD}^+$ , est capable de fournir  $1,04 \text{ mA.cm}^{-2}$ . La deuxième méthode s'appuie sur la modification supramoléculaire des nanotubes de carbone par des dérivés portant des groupements pyrène. Un des ligands du complexe de ruthénium a été modifié par des groupements pyrène et a ainsi pu être efficacement immobilisé sur les nanotubes de carbone. Grâce à la co-fonctionnalisation de ce complexe et d'un dérivé pyrène-NHS permettant le greffage covalent de la GDH, une bioanode puissante a été élaborée. Cette bioanode a permis l'obtention de densités de courant de l'ordre de  $6 \text{ mA.cm}^{-2}$ .

Cette bioanode a été utilisée, avec une biocathode à base de bilirubine oxydase sur matrice de MWCNTs déposés sur feutre de carbone pour former une biopile glucose- $\text{O}_2$ . Cette biopile a permis d'obtenir des densités de puissance de l'ordre de  $86 \text{ } \mu\text{W.cm}^{-2}$  en conditions limitantes (5 mM glucose sous air) et de l'ordre de  $140 \text{ } \mu\text{W.cm}^{-2}$  en conditions non limitantes (100 mM glucose sous bullage d' $\text{O}_2$ ).

Enfin, le quatrième et dernier chapitre a eu pour objectif d'utiliser la réduction électrocatalytique du peroxyde d'hydrogène à 2 électrons par la HRP comme alternative à la réduction à 4 électrons de  $\text{O}_2$  par les MCOs pour l'élaboration de biopiles fonctionnelles en milieu physiologique. Dans un premier temps, l'optimisation de la connexion directe de la HRP sur électrode de CNTs a été étudiée. Dans cette optique, différents dérivés de pyrène ont été étudiés pour leurs propriétés de greffage de la HRP sur les CNTs ainsi que pour leur capacité à maximiser le transfert électronique direct. Ainsi, en l'absence d'un bras espaceur, le dérivé portant un acide boronique s'est avéré être le plus attractif. Des densités maximales de courant de l'ordre de  $200 \text{ } \mu\text{A.cm}^{-2}$  ont pu être obtenues pour la réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

L'incorporation de la GOx à la bioélectrode a permis de former une biocathode capable de réduire  $\text{O}_2$  en une étape enzymatique à 2 électrons par la GOx et une étape électroenzymatique à 2 électrons par la HRP. Cette cathode optimisée a également permis l'obtention de densités de courant tout à fait intéressantes de l'ordre de  $200 \text{ } \mu\text{A.cm}^{-2}$ .

Une biopile basée sur l'association de cette dernière cathode et l'anode décrite dans le chapitre 2 a pu être élaborée. Cette pile s'est montrée parfaitement opérationnelle en condition physiologique et a menée à l'obtention de puissances de l'ordre de  $57 \text{ } \mu\text{W.cm}^{-2}$ .

En résumé, ce travail démontre le potentiel et la versatilité remarquable des CNTs pour la conception de bioélectrodes pour les biopiles enzymatiques. Ils permettent la fabrication simple d'électrodes de grande surface spécifique accompagnée d'une grande tenue mécanique. Leur morphologie, leurs propriétés électroniques et leur caractère hydrophobe ont permis d'opérer un transfert électronique direct efficace avec différentes métalloenzymes. Enfin, la possibilité de les fonctionnaliser, par voie chimique ou électrochimique, a permis de développer des



méthodes douces d'immobilisation d'enzymes et de catalyseurs moléculaires pour la fabrication de biopiles.

Le développement futur de nouvelles méthodes de fonctionnalisation ou de nouvelles méthodes de fabrication d'électrodes nanostructurées peuvent permettre l'optimisation des propriétés des biopiles enzymatiques. L'extension de leurs durées de vie ainsi que l'augmentation des densités de puissance devraient permettre, à terme, d'envisager de véritables applications pour la production d'énergie à partir d'organismes vivants et l'alimentation de petits dispositifs électroniques.



## V. Experimental part

V. Experimental part .....	187
V.1 Solvents, reagents and apparatus .....	189
V.1.1 Solvents .....	189
V.1.2 Reagents .....	189
V.1.3 Enzymes .....	190
V.1.4 Apparatus .....	190
V.2 Synthesis .....	191
V.2.1 Synthesis of 1-(11-iodoundecyl)-1H-pyrrole .....	191
V.2.2 Synthesis of 4-(4-(1H-pyrrol-1-yl)butyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine .....	191
V.2.3 Synthesis of 4-(12-(1H-pyrrol-1-yl)dodecyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine.....	192
V.2.4 Synthesis of [bis((1,10-phenanthroline-5,6-dione)(4-(4-(1H-pyrrol-1-yl)butyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine)Ru <sup>II</sup> )](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> [Ru <sup>II</sup> (PhQ) <sub>2</sub> (Bpy-pyrrole)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	192
V.2.5 Synthesis of [bis((1,10-phenanthroline-5,6-dione)( 4-(12-(1H-pyrrol-1-yl)dodecyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine)Ru <sup>II</sup> )](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> [Ru <sup>II</sup> (PhQ) <sub>2</sub> (Bpy-pyrrole)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> ....	193
V.2.6 Synthesis of 2-((11-(1H-pyrrol-1-yl)undecyl)oxy)naphthalene-1,4-dione .....	193
V.2.7 Synthesis of 1-(4-bromobutyl)pyrene .....	194
V.2.8 Synthesis of 4,4'-bis(4-(pyren-1-yl)butoxy)-2,2'-bipyridine .....	194
V.2.9 Synthesis of [(1,10-phenanthroline-5,6-dione) <sub>2</sub> ((4,4'-bis(4-pyrenyl-1-ylbutoxy)-2,2'-bipyridine)Ru <sup>II</sup> )](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> (RuQ-pyrene) .....	195
V.3 Fabrication of the electrodes.....	195
V.3.1 Fabrication of the nanostructured MWCNTs and DWCNTs pellets .....	195
V.3.2 Fabrication of the electrode by MWCNTs film transfer .....	196
V.3.3 Fabrication of the electrode by drop casting of a MWCNTs dispersion on GC electrode .....	197
V.3.4 Fabrication of the electrode by drop casting of a MWCNTs dispersion on carbon cloth electrode .....	198



## V.1 Solvents, reagents and apparatus

### V.1.1 Solvents

All organic solvents used for synthesis: chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetonitrile (MeCN), acetone, dimethylformamide (DMF), diethyl ether ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), ethylene glycol were used as received from Sigma-Aldrich. Tetrahydrofuran (THF) was always used as freshly distilled.

Acetonitrile used for electrochemistry experiments was purchased from Rathburn (HPLC grade S).

All aqueous solutions were prepared using deionized water from purelab UHQ system (ELGA). (Resistivity = 15  $\text{M}\Omega$ )

### V.1.2 Reagents

All the reagents: triphenylphosphine ( $\text{PPh}_3$ ), tetrabromomethane ( $\text{CBr}_4$ ), 18-crown-6 ether, potassium carbonate ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), n-butyl lithium 2.5 M ( $\text{BuLi}$ ), diisopropylamine (DIPA), ammonium hexafluorophosphate ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ), silver oxide ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), sodium iodide ( $\text{NaI}$ ), sodium cyanide ( $\text{NaCN}$ ), ruthenium chloride trihydrate ( $\text{RuCl}_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_3$ ), 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone (1,4-NQ), 1,4-benzoquinone (1,4-BQ), 2-methyl-1,4-benzoquinone (2-Me-1,4-BQ), 2,3,5,6-methyl-1,4-benzoquinone (tMe-1,4-BQ), 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ), sodium 1,2-naphthoquinone-sulfonate (1,2-NQ- $\text{SO}_4$ ), 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ), 1,10-phenanthroline-5,6-dione (Phendion), ruthenium hexamine ( $\text{Ru}(\text{NH}_2)_6\text{Cl}_3$ ), 4-(pyren-1-yl)butan-1-ol, pyrene-1-boronic acid (pyrene 1), 1-pyrenebutyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (pyrene-NHS, pyrene 3), nicotinamide adenine dinucleotide hydrate ( $\text{NAD}^+$ ), nicotinamide adenine dinucleotide reduced salt (NADH), bilirubin and  $\alpha$ -D-glucose were used as received from Sigma-Aldrich.

The synthesis of 1-(3-bromopropyl)-1H-pyrrole<sup>1</sup>, 11-(1H-pyrrol-1-yl)undecyl 4-methylbenzenesulfonate, N,N,N-triethyl-11-(1H-pyrrol-1-yl)undecan-1-aminium<sup>2</sup>, bis(1,10-phenanthroline-5,6-dione) $\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2^3$  and 1-(4-boronobenzyl)-3-(4-(pyren-1-yl)butanamido)pyridin-1-ium bromide (pyrene 2)<sup>4</sup> were carried out following previously reported procedures.

Multi walled carbon nanotubes (MWCNTs) and double walled carbon nanotubes (DWCNTs) were purchased from Nanocyl.

For buffer solutions and electrolytes preparation: sodium phosphate monobasic ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ), sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), tertbutyl ammonium perchlorate ( $\text{tBu}_4\text{NClO}_4$ ), lithium perchlorate ( $\text{LiClO}_4$ ), potassium chloride (KCl) and PBS tablet (pH 7.4) were used as received from Sigma Aldrich.

### V.1.3 Enzymes

All enzymes: Glucose Oxidase (from *Aspergillus niger*,  $139 \text{ U mg}^{-1}$ ), Catalase (from bovine liver,  $16000 \text{ U.mg}^{-1}$ ), Laccase (from *Trametes versicolor*,  $210 \text{ U mg}^{-1}$ ), Glucose Dehydrogenase (from *Pseudomonas sp.*,  $235 \text{ U mg}^{-1}$ ), Tyrosinase (from mushroom,  $6850 \text{ U mg}^{-1}$ ), bilirubin oxidase (from *Myrothecium verrucaria*,  $18 \text{ U mg}^{-1}$ ) and Horseradish Peroxidase ( $193 \text{ U mg}^{-1}$ ) were used as received from Sigma-Aldrich.

### V.1.4 Apparatus

#### V.1.4.1 Electrochemistry measurements

##### - Organic media

The electrochemical experiments performed in MeCN were carried out in a three-electrode electrochemical cell under dry argon atmosphere and in a glove box ( $[\text{O}_2] < 20 \text{ ppm}$ ). The surface of glassy carbon (GC) electrodes were polished with a  $2 \mu\text{m}$  diamond paste purchased from Presi (France), and rinsed successively with water, acetone and ethanol.

A Pt wire placed in a separated compartment was used as counter electrode and the  $\text{Ag}/\text{AgNO}_3$  10 mM in MeCN + TBAP (0.1 M) served as reference electrode in organic media. Potentials given in organic and aqueous media are referred to the ( $\text{Ag}/\text{AgNO}_3$ ) electrode and the saturated calomel electrode (SCE) respectively

All electrochemical experiments were recorded on an Autolab PGSTAT100 potentiostat.

##### - Aqueous media

The electrochemical characterizations of all electrodes (cyclic voltammetry, chronoamperometry, open circuit potential and constant load discharge measurements) in aqueous solutions were carried out in a three-electrode electrochemical cell using a Biologic potentiostat. A platinum grid was used as the counter electrode and a saturated calomel electrode (SCE) served as reference electrode. All potentials given in this work are referred to the SCE reference electrode.

For the electrochemical characterization of the biofuel cells, the anode was set as working electrode while the cathode was plugged as counter-reference electrode.

All experiments were conducted in 0.2M phosphate buffer or in phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4) as the supporting electrolyte at 25 or 37°C.

#### V.1.4.2 Product analysis and characterizations

NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 operating at 400.0 MHz for <sup>1</sup>H. ESI mass spectra were recorded with a Bruker APEX-Qe ESI FT-ICR mass spectrometer. UV-visible spectra and enzymatic kinetics were recorded with a Perkin Elmer Lambda 650 spectrophotometer with a quartz cuvette (1 cm depth).

## V.2 Synthesis

### V.2.1 Synthesis of 1-(11-iodoundecyl)-1H-pyrrole

4 g of 11-(1H-pyrrol-1-yl)undecyl 4-methylbenzenesulfonate was dissolved in 60 mL of acetone with an excess of NaI. The mixture was refluxed under vigorous stirring for 3h. The suspension was then filtered and the solvent was removed under reduce pressure to afford 3.4 g of the pure product as a brown oil (96% yield).

<sup>1</sup>H NMR:  $\delta_H$  /ppm (400 Mhz, CDCl<sub>3</sub>): 1.25-1.30 (m, 12H), 1.38 (q, J = 7.6Hz, 2H), 1.75 (q, J = 6.8Hz, 2H), 1.81 (q, J = 6.8Hz), 3.18 (t, J = 7.2Hz, 2H), 3.86 (t, J = 7.2Hz, 2H), 6.13 (t, J = 2Hz, 2H), 6.64 (t, J = 2Hz, 2H)

MS (ESI<sup>+</sup>): 348<sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>)

### V.2.2 Synthesis of 4-(4-(1H-pyrrol-1-yl)butyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine

In a dry round bottom flask flushed with argon, 3.3 mL of diisopropyl amine (23.4 mmol) were added to 15 mL of freshly distilled THF under argon atmosphere. The flask was cooled down to 0°C with an acetone/ice bath. Then, 9.6 mL of BuLi 2.5 M (24 mmol) were added drop wise to the stirred mixture at 0°C under argon. The mixture was stirred for 15 min. Then, 2.1 g of 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (11.4 mmol) in 80 mL of dry THF were added drop wise (30 min) and the mixture was stirred for another 1.5 h at 0°C, under argon. Subsequently, 1.6 g of 1-(3-bromopropyl)-1H-pyrrole (8.5 mmol) in 20 mL of dry THF were added drop wise (15 min) and the mixture was stirred for another 1 h at 0°C, under argon. The reaction was then stopped by



adding 60 mL of cold water. The crude product was extracted with 2x 100 of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic phase was then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvents were removed under vacuum. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeCN, 8 : 2) to give 850 mg of the pure product (25% yield) as white crystals.

<sup>1</sup>H NMR:  $\delta_H$  /ppm (400 Mhz, CDCl<sub>3</sub>): 1.70 (q, J = 8.8Hz, 2H), 1.83 (q, J = 7.2Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.70 (t, J = 7.6Hz, 2H), 3.90 (t, J = 7.2Hz, 2H), 6.13 (t, J = 2Hz, 2H), 6.63 (t, J = 2Hz, 2H), 7.10 (dd, J<sub>trans</sub> = 17.6Hz and J<sub>cis</sub> = 5.2Hz, 2H), 8.22 (d, J = 7.2Hz, 2H), 8.54 (t, J = 6Hz, 2H)

MS (ESI<sup>+</sup>): 292<sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>), 314<sup>+</sup> (M+Na<sup>+</sup>)

### V.2.3 Synthesis of 4-(12-(1H-pyrrol-1-yl)dodecyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine

In a dry round bottom flask flushed with argon, 3.5 mL of diisopropyl amine (24 mmol) were added to 20 mL of freshly distilled THF under argon atmosphere. The flask was cooled down to 0°C with an acetone/ice bath. Then, 9.6 mL of BuLi 2.5 M (24 mmol) were added drop wise to the stirred mixture at 0°C under argon. The mixture was stirred for 15 min. Then, 2 g of 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (10.8 mmol) in 80 mL of dry THF were added drop wise (30 min) and the mixture was stirred for another 1 h at 0°C, under argon. Subsequently, 3.15 g of 1-(11-bromoundecyl)-1H-pyrrole (10.5 mmol) in 40 mL of dry THF were added drop wise (1 h) and the mixture was stirred for another 1 h at 0°C, under argon. The reaction was then stopped by adding 80 mL of cold water. The crude product was extracted with 2x 200 of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic phase was then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvents were removed under vacuum. The 3.6 g of crude product were purified by chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeCN, 9 : 1) to give 1,3 g of the pure product (30% yield) as white crystals.

<sup>1</sup>H NMR:  $\delta_H$  /ppm (400 Mhz, CDCl<sub>3</sub>): 1.25-1.32 (m, 12H), 1.28-1.40 (m, 4H), 1.67-1.80 (m, 4H), 2.48 (s, 3H), 2.73 (t, J = 8Hz, 2H), 3.87 (t, J = 7.2, 2H), 6.15 (t, J = 2Hz, 2H), 6.66 (t, J = 2Hz, 2H), 7.18 (d, J = 4.4Hz, 2H), 3.30 (m, 2H), 8.58 (t, J = 4.8Hz, 2H)

MS (ESI<sup>+</sup>): 404<sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>)

### V.2.4 Synthesis of [bis((1,10-phenanthroline-5,6-dione)(4-(4-(1H-pyrrol-1-yl)butyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine)Ru<sup>II</sup>)(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> [Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

The synthesis of [bis(Phendion) (4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine) ruthenium(II) hexafluorophosphate (Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(bpy-pyrrole))] proceeded as follows. A solution of 4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine (21 mg) and [Ru(Phendion)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (40 mg) in ethylene glycol (2.5

mL) was refluxed for 40 min under nitrogen. After cooling to room temperature, an aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  was added, allowing the formed product to precipitate. The orange brown precipitate was then filtrated, washed with water, and dried with  $\text{Et}_2\text{O}$  yielding to 58 mg of product (78% yield).

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$ /ppm (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 1.57 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 2.74 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.87 (m, 2H), 5.93 (s, 2H), 6.68 (s, 2H), 7.21 (m, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.58 (m, 2H), 7.71 (m, 2H), 7.80 (m, 2H), 7.98 (m, 1H), 8.03 (m, 1H), 8.66 (m, 3H), 8.73 (m, 3H).

MS (ESI<sup>+</sup>): 406.7 ( $\text{M}-2\text{PF}_6^{2+}$ ), 958.1 ( $\text{M}-\text{PF}_6^+$ ).

UV-vis (DMF):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) = 295 (29 200), 360 (11 200), 444 (12 400).

#### V.2.5 Synthesis of [bis((1,10-phenanthroline-5,6-dione)(4-(12-(1H-pyrrol-1-yl)dodecyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine)Ru<sup>II</sup>)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> [Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

The synthesis of [bis(Phendion) (4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine) ruthenium(II) hexafluorophosphate proceeded as follows. A solution of 4-(12-(1H-pyrrol-1-yl)dodecyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine (29 mg) and  $[\text{Ru}(\text{Phendion})_2\text{Cl}_2]$  (40 mg) in ethylene glycol (2.5 mL) was refluxed for 40 min under nitrogen. After cooling to room temperature, an aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  was added, allowing the formed product to precipitate. The orange brown precipitate was then filtrated, washed with water, and dried with  $\text{Et}_2\text{O}$  yielding to 68 mg of product (83% yield).

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$  ppm (400 MHz, DMSO): 1.10-1.30 (m, 16H), 1.55-1.68 (m, 4H), 2.70-2.80 (m, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.75-3.90 (m, 2H), 5.93 (broad, 2H), 6.68 (broad, 2H), 7.15-7.30 (m, 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.55-7.65 (m, 2H), 7.72 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 7.80 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 7.90-8.05 (m, 2H), 8.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.70-8.90 (m, 4H)

MS (ESI<sup>+</sup>): 462<sup>2+</sup> ( $\text{M}-2\text{PF}_6$ ), 1069<sup>+</sup> ( $\text{M}-\text{PF}_6$ )

UV-vis (DMF):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) = 298 (29 500), 378 (11 800), 458 (13 600).

#### V.2.6 Synthesis of 2-((11-(1H-pyrrol-1-yl)undecyl)oxy)naphthalene-1,4-dione

In 10 mL of  $\text{CHCl}_3$ , 80 mg of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone were solubilized along with 110 mg of  $\text{Ag}_2\text{O}$ . Then 165 mg of 1-(11-iodoundecyl)-1H-pyrrole was added to the suspension. The

mixture stirred and heated to reflux for 3h. The suspension was then filtered and the organic phase was then dried under vacuum. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub> : MeOH , 9:1) to give 95 mg (52% yield) of pure product as a yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR: δ<sub>H</sub> ppm (400 Mhz, CDCl<sub>3</sub>): 1.20-1.30 (m, 12H), 1.45-1.60 (m, 4H), 1.75 (q, J = 6.4Hz, 2H), 1.92 (q, J = 6.8Hz, 2H), 3.86 (t, J = 7.2Hz, 2H), 4.14 (t, J = 6.4Hz, 2H), 5.95 (s, 1H), 6.13 (t, J = 2Hz, 2H), 6.64 (t, J = 2Hz, 2H), 7.58 (t, J = 7.6Hz, 1H), 7.69 (t, J = 6.4Hz, 1H), 7.86 (d, J = 6.8Hz, 1H), 8.12 (d, J = 7.2Hz, 1H)

MS (ESI<sup>+</sup>): 394<sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>), 416<sup>+</sup> (M+Na<sup>+</sup>)

### V.2.7 Synthesis of 1-(4-bromobutyl)pyrene

In 50 mL of freshly distilled THF were solubilized 1 g of 4-(pyren-1-yl)butan-1-ol (3.64 mmol), 1.46 g of CBr<sub>4</sub> (4.4 mmol) and 1.15 g of PPh<sub>3</sub> (4.4 mmol) under argon atmosphere. The mixture was then let to react for 20h under argon at room temperature. The white precipitate formed was filtered off and the filtrate was dried under vacuum. The crude product was then purified by chromatography on silica gel (cyclohexane: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1) to give 1 g (81% yield) of pure product as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR: δ<sub>H</sub> ppm (400 Mhz, CDCl<sub>3</sub>): 2.04 (q, J = 4Hz, 4H), 3.39 (t, J = 6.8Hz, 2H), 3.47 (t, J = 6Hz, 2H), 7.86 (d, J = 7.6, 1H), 7.99 (t, J = 7.6Hz, 1H), 8.03 (d, J = 1,2Hz, 2H), 8.11 (d, J = 8.8Hz, 2H), 8.16 (d, J = 2.8Hz, 1H), 8.18 (d, J = 2.8Hz, 1H), 8.27 (d, J = 9.2Hz, 1H)

MS (ESI<sup>+</sup>): 337<sup>+</sup>(M+H<sup>+</sup>)

### V.2.8 Synthesis of 4,4'-bis(4-(pyren-1-yl)butoxy)-2,2'-bipyridine

100 mg of 2,2'-bipyridine-4,4'-diol (0.53 mmol), 400 mg of 1-(4-bromobutyl)pyrene (1.2 mmol), 440 mg of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.2 mmol) and 300 mg of 18-crown-6 (1.2 mmol) were added to a 140 mL of dry acetone solution. The mixture was then refluxed for 48h (the white product precipitate as it forms). The obtained suspension was filtered and washed successively with H<sub>2</sub>O and acetone. The powder was then dried with Et<sub>2</sub>O. The pure product was directly obtained as a white solid (315 mg, 84% yield).

<sup>1</sup>H NMR: δ<sub>H</sub> ppm (400 Mhz, CDCl<sub>3</sub>): 2.05-2.15 (m, 8H), 3.46 (t, J = 7.6Hz, 4H), 4.36 (t, J = 5.2Hz, 4H), 6.96 (d, J = 6Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8Hz, 2H), 7.98 (t, J = 7.6Hz, 2H), 8.01 (s, 4H), 8.10-8.15 (m, 8H), 8.29 (d, J = 9.2Hz, 2H), 8.35-8.45 (broad, 2H), 8.46 (d, J = 6.4Hz, 2H)

MS (ESI<sup>+</sup>): 701<sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>)

### V.2.9 Synthesis of [(1,10-phenanthroline-5,6-dione)<sub>2</sub>((4,4'-bis(4-pyrenyl-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine)Ru<sup>II</sup>)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (RuQ-pyrene)

A solution of 48 mg of 4,4'-bis(4-pyrenyl-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine (68 μmol) and 40 mg of bis(1,10-phenanthroline-5,6-dione)Ru<sup>II</sup>Cl<sub>2</sub> (68 μmol) in 3 mL of ethylene glycol was refluxed for 1.5 h under argon. After cooling down to room temperature, a 10mL aqueous solution of saturated NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> was added, allowing the as-formed product to precipitate. The orange brown precipitate was then filtrated, washed with water and Et<sub>2</sub>O, yielding 70 mg of product (68% yield).

<sup>1</sup>H NMR: δ<sub>H</sub>/ppm (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN): 1.98-2.01 (m, 8H), 3.43 (d, J = 8Hz, 4H), 4.22-4.26 (m, 4H), (dd, J = ,2H), 7.53 (d, J = 6.4Hz 2H), 7.57-7.64 (m, 4H), 7.91-7.96 (m, 4H), 7.97-8.02 (m, 4H), 8.04-8.06 (m, 6H), 8.09-8.14 (m, 4H), 8.15-8.21 (m, 6H), 8.33 (d, J = 10Hz, 2H), 8.50 (d, J = 7.6Hz, 2H)

MS (ESI<sup>+</sup>): 611.2<sup>2+</sup> (M-2PF<sub>6</sub>), 1367.3<sup>+</sup> (M-PF<sub>6</sub>)

UV/Vis (DMF) : λ<sub>max</sub>/nm (ε/M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) = 312 (42700), 328 (61800), 345 (80900), 442 (14700)

## V.3 Fabrication of the electrodes

### V.3.1 Fabrication of the nanostructured MWCNTs and DWCNTs pellets

#### V.3.1.1 Bioanode MWCNTs/Gox/Cat/1,4-NQ

The MWCNT pellets were obtained by soft grinding of a mixture of 100 μL of water, 5mg of p-naphtoquinone, 15mg of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* (139 U mg<sup>-1</sup>), 10mg of Catalase from bovine liver (16000 U mg<sup>-1</sup>) and 35 mg of MWCNTs. The homogenous paste is then compressed in a hydraulic press to obtain a pellet with 5mm in diameter and 4mm thickness. A copper or gold wire is connected to one side of the pellet by a conductive adhesive. Silicon is added to cover the sides, electrical wires and conductive adhesive, leaving one side of the pellet that corresponds to the electrochemical surface of the electrode with a geometrical surface of 0.2 cm<sup>2</sup>. After incubation of the electrode in PBS for 5min, 50μL of a mixture of 0.1 M pyrrole and 0.1 M Polystyrene sulfonate (PSS) was drop-casted onto the electrode surface.

Electropolymerisation was then performed at 0.9V for 10 minutes, affording a Polypyrrole/PSS (PPy/PSS) polymer film on the surface of the electrode. The bioelectrode has a final volume of 0.08 mL.

#### V.3.1.2 Biocathode MWCNTs/Lac

A similar procedure as for the bioanode was employed using 15 mg of Laccase from *Tramete Versicolor* (210 U mg<sup>-1</sup>) and 35 mg of MWCNTs. A sheet of Nafion (Alpha Aesar, NRE-212, 0.05mm thick sheet) was deposited in order to overlap the remaining electrode surface.

#### V.3.1.3 Biocathode MWCNTs/PPO

The same procedure was employed by using 5mg of Tyrosinase from *mushroom* (6850 U mg<sup>-1</sup>) and 20 mg of MWCNTs to form the MWCNTs/PPO pellet electrically contacted and isolated (5mm diameter and 2 mm thickness). After incubation of the electrode in phosphate buffer 0,2 M pH7 for 5 min, 20 µl of a 0.5% solution of Nafion<sup>®</sup> (diluted 10 times from a Nafion<sup>®</sup> 117 solution, from Sigma-Aldrich, ~5% in a mixture of lower aliphatic alcohols and water) is finally drop-casted onto the electrode surface and dried.

#### V.3.1.4 Bioanode DWCNTs/GOx/mediators

The MWCNT pellets were obtained by soft grinding of a mixture of 100 µL of water, 3 mmol of the quinone derivative (1,4-NQ ; 1,4-BQ ; 2-Me-1,4-BQ ; tMe-1,4-BQ ; 1,2-NQ ; 1,2-NQ-SO<sub>4</sub> ; 9,10-PQ ; Phendion), 15 mg of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* (139 U.mg<sup>-1</sup>), 10mg of Catalase from bovine liver (16000 U.mg<sup>-1</sup>) and 35 mg of DWCNTs. The compression of the pellets and electrical connexion of the electrode were realized in the same way as for the MWCNTs bioanode.

### V.3.2 Fabrication of the electrode by MWCNTs film transfer

#### V.3.2.1 fabrication and transfer of the MWCNTs film

For the preparation of the film commercial grade Multi-Walled Carbon Nanotubes (9.5nm diameter, purity > 95%) were obtained from Nanocyl. MWCNTs films were prepared using a modified procedure from Wu et al<sup>5</sup>. MWCNTs (10 mg) were dispersed in 500mL of pure water and sonicated for 30 min. After the solution was let to decant overnight, the remaining transparent supernatant (400 mL) was filtered over cellulose nitrate filter (Sartorius, 0.45 µm, 3.5 cm diameter). The resulting deposit of MWCNTs was then transferred by deposition on a

GC electrode (surface area  $0.07 \text{ cm}^2$ ) followed by a dissolution of the membrane by several washings with acetone.

#### V.3.2.2 Functionalization of the MWCNTs film with poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]

Electropolymerization of the [Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] was performed in MeCN. MWCNT electrodes were functionalized in MeCN by electropolymerization between 0 and 0.9 V Vs Ag/AgNO<sub>3</sub> (40 scans) in a 1 mM [Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] solution. The electrodes were then successively rinsed with MeCN and water.

#### V.3.2.3 Functionalization of the MWCNTs film with poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]/poly-(R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole)-GDH and poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)]-GDH

In water, a 20  $\mu\text{L}$  phosphate buffer solution of 1  $\text{mg mL}^{-1}$  of enzyme (GDH or PPO) and 1 mM of pyrrole monomer [Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] was drop casted onto the MWCNTs film or (R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>-pyrrole) was drop casted onto the MWCNTs/poly-[Ru<sup>II</sup>(PhQ)<sub>2</sub>(Bpy-pyrrole)] film. The deposit was then dried under vacuum for 15 minutes. Then dry deposit was electropolymerized at 0.8V Vs ECS in a LiClO<sub>4</sub> solution for 2 minutes.

#### V.3.2.4 Functionalization of the MWCNTs film with pyrene-1 or 2 or 3/HRP and pyrene-1/HRP-GOx

The MWCNTs film electrode was first incubated in a DMF solution containing 10 mM of one of the 3 pyrenes derivatives: pyrene 1 ; pyrene 2 or pyrene 3. The stacking process was let to react for 1h and the electrodes were then rinsed several times in pure water to remove the residual DMF of the surface.

The functionalized electrodes were then incubated overnight in a 2  $\text{mg mL}^{-1}$  of enzyme (HRP and/or GOx according to the electrode type) in phosphate buffer at pH 8 at 4°C. Then, the electrodes were rinsed and conserved in PBS pH 7 when not used.

### V.3.3 Fabrication of the electrode by drop casting of a MWCNTs dispersion on GC electrode

#### V.3.3.1 Drop casting of the MWCNTs onto GC electrode

Commercial grade thin Multi-Walled Carbon Nanotubes (9.5nm diameter, purity > 95 %,) were obtained from Nanocyl. The MWCNT electrodes were obtained by dropcasting 20  $\mu\text{L}$  of a

MWCNT dispersion in 1-methyl-2-pyrrolidinone ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), affording a  $5\text{-}\mu\text{m}$ -thick homogeneous MWCNT film on GC electrode.

#### V.3.3.2 Fonctionnalisation of the drop cast MWCNTs electrode with RuQ-pyrene and RuQ-pyrene/pyrene-NHS/GDH

The RuQ-pyrene/MWCNTs electrodes were prepared by successive incubation in a RuQ-pyrene solution in DMF starting from 0 to  $8\text{mM}$  for 1h. After each incubations, the electrodes were rinsed several times with deionized water.

The RuQ-pyrene/GDH MWCNTs electrodes were prepared by incubation in different ratios of RuQ-pyrene/Pyrene-NHS in DMF. The bi-functionalized electrodes were then incubated for 6h in  $40\mu\text{L}$  of a  $2\text{mg mL}^{-1}$  solution of GDH in phosphate buffer pH7 at  $4^{\circ}\text{C}$ .

After each incubations, the electrodes were rinsed several times with deionized water.

#### V.3.4 Fabrication of the electrode by drop casting of a MWCNTs dispersion on carbon cloth electrode

##### V.3.4.1 Drop casting of the MWCNTs onto carbon cloth electrode

Commercial grade thin Multi-Walled Carbon Nanotubes ( $9.5\text{nm}$  diameter, purity  $> 95\%$ ), were obtained from Nanocyl. The MWCNT electrodes were obtained by dropcasting  $20 \mu\text{L}$  of a MWCNT dispersion in 1-methyl-2-pyrrolidinone ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), affording a  $5\text{-}\mu\text{m}$ -thick homogeneous MWCNT film on carbon cloth electrode.

##### V.3.4.2 Fonctionnalisation of the drop cast carbon cloth/MWCNTs electrode with RuQ-pyrene/pyrene-NHS/GDH

The RuQ-pyrene/GDH carbon cloth/MWCNTs electrodes were prepared by incubation in 1:1 ratio at  $5 \text{ mM}$  of RuQ-pyrene/Pyrene-NHS in DMF. The bi-functionalized electrodes were then incubated for 6h in  $40\mu\text{L}$  of a  $2\text{mg mL}^{-1}$  solution of GDH in phosphate buffer pH7 at  $4^{\circ}\text{C}$ .

After each incubations, the electrodes were rinsed several times with deionized water.

##### V.3.4.3 Fonctionnalisation of the drop cast carbon cloth/MWCNTs electrode with bilirubin/BOD



The bilirubin/BOD carbon cloth/MWCNTs electrode was prepared by incubation in a 10 mM solution of bilirubin in DMF for 1 h. The functionalized electrode was then incubated for 2h in 40 $\mu$ L of a 5 mg mL<sup>-1</sup> solution of BOD in phosphate buffer pH7 at 25°C.

After each incubations, the electrodes were rinsed several times with deionized water.

#### V.3.4.4 Fonctionnalisation of the drop cast carbon cloth/MWCNTs electrode with pyrene 1/HRP-GOx

The pyrene 1/HRP-GOx carbon cloth/MWCNTs electrode was prepared by incubation in a 10 mM solution of pyrene 1 in DMF for 1 h. The functionalized electrodes weas then incubated overnight in a 2 mg mL<sup>-1</sup> of HRP/GOx (10:1) in phosphate buffer at pH 8 at 4°C. Then, the electrodes were rinsed and conserved in PBS pH 7 when not used.

After each incubations, the electrodes were rinsed several times with deionized water.

1. S. Cosnier, A. Deronzier, and J.-C. Moutet, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1986, **207**, 315–321.
2. L. Coche-Guerente, A. Deronzier, B. Galland, J. C. Moutet, P. Labbe, G. Reverdy, Y. Chevalier, and J. Amhrar, *Langmuir*, 1994, **10**, 602–610.
3. C. A. Goss and H. D. Abruna, *Inorg Chem*, 1985, **24**, 4263–4267.
4. Y.-J. Huang, W.-J. Ouyang, X. Wu, Z. Li, J. S. Fossey, T. D. James, and Y.-B. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 1700–1703.
5. Z. Wu, Z. Chen, X. Du, J. M. Logan, J. Sippel, M. Nikolou, K. Kamaras, J. R. Reynolds, D. B. Tanner, A. F. Hebard, and A. G. Rinzler, *Science*, 2004, **305**, 1273–1276.



## **Liste des abréviations**



1,4-NQ : 1,4-naphtoquinone  
 ABTS : 2,2-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique)  
 ADH : alcool déshydrogénase  
 AIDH : aldéhyde déshydrogénase  
 ADN : acide désoxyribonucléique  
 Ag<sup>+</sup>/Ag : électrode de référence en solution organique, [Ag] = [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>  
 BOD : bilirubine oxydase  
 BQ : benzoquinone  
 BzV : benzyl viologène  
 Cat : Catalase  
 CD : cyclodextrine  
 CDH : cellobiose déshydrogénase  
 CF : fibre de carbone  
 CNT : nanotube de carbone  
 CNTF : forêt de nanotube de carbone  
 Cyt Ox : cytochrome oxydase  
 CV : voltampérométrie cyclique  
 CVD : procédé de synthèse de nanotube de carbone par « déposition de vapeur chimique »  
 DEL : diode électroluminescente  
 DET : transfert électronique direct  
 DMFc : diméthyl ferrocène  
 DWCNT : nanotube de carbone double paroi  
 ECS : électrode au calomel saturé (référence en milieu aqueux)  
 F : faraday  
 FAD : flavine adénine dinucléotide  
 Fc : ferrocène  
 FcMeOH : ferrocène méthanol  
 FDH : fructose déshydrogénase  
 f.e.m. : force électromotrice  
 GBFC : biopile à glucose  
 GC : carbone graphite  
 GDH : glucose déshydrogénase  
 GOx : glucose oxydase  
 H<sub>2</sub>ase : hydrogénase  
 HRP : horse radish peroxidase  
 K<sub>M</sub> : constante de Michaelis-Menten  
 K<sub>M</sub><sup>app</sup> : constante de Michaelis-Menten apparente  
 Lac : laccase  
 MB : bleu de méthylène

MBQ : méthylbenzoquinone  
 MCO : terme pour désigner les enzymes possédant plusieurs sites actifs à base d'atome de cuivre, « Multi Copper Oxidase »  
 MD : ménadione  
 MET : transfert d'électron médié (ou indirect)  
 MWCNT : nanotube de carbone multi parois  
 NAD : nicotinamide adénine dinucléotide  
 NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
 NHS : N-hydroxysuccinimide  
 NP : nano particule  
 NQ : naphthoquinone  
 OCV : potentiel en circuit ouvert  
 PAC : pile à combustible  
 PACE : pile à combustible enzymatique  
 PACM : pile à combustible microbienne  
 pBCB : poly Brilliant Cresyl Blue  
 Phendion : 1,10-phenanthroline-5,6-dione  
 PPO : polyphénol oxydase, tyrosinase  
 PPY/PSS : polypyrrole / polystyrène sulfonate  
 PQ : phénanthrènequinone  
 PVA : polyvinyl acrilamide  
 PVI : polyvinyl imidazole  
 PVP : polyvinyl pyridine  
 PQQ : pyrroloquinoline quinone  
 PyDH : pyranose déshydrogénase  
 PyOx : pyranose oxydase  
 Q : charge  
 ROS: espèce réactive de l'oxygène  
 RuQ-pyrene:  $[(1,10\text{-phenanthroline-5,6-dione})_2((4,4'\text{-bis(4-pyren-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine})\text{Ru}^{2+})](\text{PF}_6)_2$   
 SAM : monocouche auto-asssemblée  
 SOD : superoxyde dismutase  
 SWCNT : nanotube de carbone mono paroi  
 TBAP : tétrabutylammonium perchlorate  
 TTF : tétrathiafulvalène  
 $v$  : vitesse de balayage en tension  
 $\omega$  : vitesse angulaire de rotation de l'électrode  
 $k$  : constante catalytique  
 $A$  : surface de l'électrode

## Liste des publications

**Direct electron transfer between tyrosinase and multi-walled carbon nanotubes for bioelectrocatalytic oxygen reduction**

Bertrand Reuillard, Alan Le Goff, Charles Agnès, Abdelkader Zebda, Michael Holzinger and Serge Cosnier – *Electrochemistry Communications* (2012), 20, 19

DOI: 10.1016/j.elecom.2012.03.045

**High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix**

Bertrand Reuillard, Alan Le Goff, Charles Agnès, Michael Holzinger, Abdelkader Zebda, Chantal Gondran, Kamal Elouarzaki and Serge Cosnier – *Physical Chemistry Chemical Physics* (2013), 15, 4892

DOI: 10.1039/C3CP50767J

**A double-walled carbon nanotube-based glucose/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biofuel cell operating under physiological conditions**

Charles Agnès, Bertrand Reuillard, Alan Le Goff, Michael Holzinger and Serge Cosnier – *Electrochemistry Communications* (2013), 34, 105

DOI: 10.1016/j.elecom.2013.05.018

**Supercapacitor/biofuel cell hybrids based on wired enzymes on carbon nanotube matrices: autonomous reloading after high power pulses in neutral buffered glucose solutions**

Charles Agnès, Michael Holzinger, Alan Le Goff, Bertrand Reuillard, Kamal Elouarzaki, Sophie Tingry and Serge Cosnier – *Energy and Environmental Science* (2014), 7, 1884

DOI: 10.1039/C3EE43986K

**Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with boronic acids for the wiring of glycosylated redox enzymes in oxygen-reducing biocathodes**

Bertrand Reuillard, Alan Le Goff, Michael Holzinger and Serge Cosnier – *Journal of Material Chemistry B* (2014), 2, 2228

DOI: 10.1039/C3TB21846E

**Polypyrrolic Bipyridine Bis(phenantrolinequinone) Ru(II) Complex/Carbon Nanotube Composites for NAD-Dependent Enzyme Immobilization and Wiring**

Bertrand Reuillard, Alan Le Goff and Serge Cosnier – *Analytical Chemistry* (2014), 86, 4409

DOI: 10.1021/ac500272v

**Non-covalent double functionalization of carbon nanotubes with a NADH oxidation Ru(II)-based molecular catalyst and a NAD-dependent glucose dehydrogenase**

Bertrand Reuillard, Alan Le Goff and Serge Cosnier – *Chemical Communications* (2014), 50, 11731

DOI: 10.1039/C4CC04758C







## **Carbon nanotube-based bioelectrodes for Glucose/O<sub>2</sub> biofuel cells**

**Abstract:** This work focuses on the optimization of the electrical wiring of glucose oxidizing and dioxygen reducing enzymes on carbon nanotube (CNT) matrixes for glucose biofuel cells.

In the first part, glucose oxidase (GOx) mediated electron transfer (MET) is optimized in nanostructured CNTs matrixes by mechanical compression of a CNTs/GOx composite containing 1,4-naphthoquinone as redox mediator. This bioanode was then combined with MCOs (laccase and tyrosinase) based biocathodes. The GOx-NQ/Lac biofuel cell was able to deliver a maximum power density of 1.5 mW.cm<sup>-2</sup>. The use of this biofuel cell in short/long time discharge and in storage has also been studied. The second part presents the preparation of another bioanode based on the indirect wiring of a NAD<sup>+</sup>-dependant glucose dehydrogenase (GDH-NAD<sup>+</sup>) as an alternative for glucose oxidation. The GDH-NAD<sup>+</sup> has been combined with an NADH oxidation catalyst by two different techniques. The first one involves the encapsulation of the protein in the metallopolymer redox film, whereas the second one relies on the supramolecular modification of the CNTs by the molecular catalyst and the enzyme. Both bioanodes showed good catalytic properties toward glucose oxidation in presence of NAD<sup>+</sup> with respectively 1.04 mA cm<sup>-2</sup> and 6 mA cm<sup>-2</sup>. The latter has been combined with a BOD based biocathode to form a biofuel cell exhibiting maximum power densities of 140 μW cm<sup>-2</sup>. The last part of this work focuses on the design of a bienzymatic biocathode for O<sub>2</sub> reduction. The DET of horseradish peroxidase (HRP) was first investigated and optimized by modification of the CNTs with pyrenes derivatives. The combination of the HRP with the GOx on the same electrode enables an efficient reduction of O<sub>2</sub> in a 2-step process. The biocathode could exhibit maximum currents densities of 200 μA cm<sup>-2</sup>. This cathode along with the previous GDH bioanode formed a biofuel cell functional in physiological conditions and 10 mM NAD<sup>+</sup> showing maximum power densities of 57 μW cm<sup>-2</sup>.

**Keywords:** bioelectrocatalysis, biofuel cells, carbon nanotube functionalization, redox mediators

---

## **Elaboration de bioélectrodes à base de nanotubes de carbone pour la réalisation de biopiles enzymatiques Glucose/O<sub>2</sub>**

**Résumé :** Ce mémoire est consacré à l'optimisation de la connexion enzymatique d'enzymes pour l'oxydation du glucose et la réduction de O<sub>2</sub> sur matrices de nanotube de carbone (CNT) dans les biopiles à glucose.

Dans un premier temps, le transfert électronique indirect de la glucose oxydase (GOx) est optimisé dans une matrice nanostructurée de CNT contenant la 1,4-naphthoquinone comme médiateur rédox. Cette bioanode a ensuite été combinée avec des biocathodes similaires à bases d'enzymes à cuivre (laccase et tyrosinase). La biopile GOx-NQ/Lac a permis d'obtenir des puissances maximales de l'ordre de 1,5 mW.cm<sup>-2</sup>. Les utilisations de cette pile en décharge courte, longue et sa stabilité dans le temps ont également été étudiées. La seconde partie présente la préparation d'une autre anode basée sur la connexion indirecte d'une glucose déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante (GDH-NAD<sup>+</sup>) comme alternative pour l'oxydation du glucose. La GDH-NAD<sup>+</sup> a été combinée avec un catalyseur d'oxydation de NADH par différentes méthodes. Tout d'abord, elle a été encapsulée au sein du métallopolymère rédox, puis, la modification supramoléculaire a dans un second temps permis d'immobiliser le catalyseur moléculaire et l'enzyme à la surface des CNTs. Ces deux bioanodes ont permis respectivement l'obtention de courants catalytiques d'oxydation du glucose de 1,04 et 6 mA.cm<sup>-2</sup>. La seconde bioanode a été combinée avec une biocathode à base de BOD et a permis l'obtention de densités de courants maximales de l'ordre de 140 μW.cm<sup>-2</sup>. La dernière partie concerne l'élaboration d'une biocathode bienzymatique pour la réduction de O<sub>2</sub>. Le DET de la HRP sur CNTs a dans un premier temps été optimisé par modification de la surface par différents dérivés pyrène. Ensuite, la combinaison de la GOx et de la HRP sur la même électrode a permis de réduire efficacement O<sub>2</sub> en 2 étapes. La biocathode est capable de délivrer une densité de courant maximale de l'ordre de 200 μA.cm<sup>-2</sup>. Cette dernière, combinée avec la bioanode GDH présentée précédemment a permis d'obtenir une biopile opérationnelle en conditions physiologiques et 10 mM de NAD<sup>+</sup>, en étant capable de débiter une densité de puissance maximale de l'ordre de 57 μW.cm<sup>-2</sup>.

**Mots clefs:** bioélectrocatalyse, biopile, fonctionnalisation de nanotubes de carbone, médiateurs rédox